

Zur Rolle von epigenetisch dysregulierten microRNAs beim klarzelligen Nierenzellkarzinom

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

M. Sc. Julia Liep

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Detlev Krüger
2. Prof. Dr. Michael Lein
3. PD Dr. Anja Rabien

Tag der mündlichen Prüfung: 22.Juni 2016

Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for about 3 % of all human malignant tumors. Approximately 25 % of diagnosed RCCs have already metastasized. Due to poor prognosis of metastatic RCC, there is an urgent need for new therapies and prognostic and diagnostic markers to identify high-risk patients. Here microRNAs (miRNAs) might be promising new molecular biomarkers. miRNAs are involved in a variety of biological processes and play a pivotal role in the development and progression of various types of tumors. By post-transcriptional regulation of gene expression, one single miRNA can affect up to several hundred different targets, while one target can be regulated by various miRNAs. For the clear cell RCC subtype (ccRCC), representing 70 % of all RCCs, a comprehensive miRNA expression profile was already established. In this profiling several ccRCC-associated, predominantly down-regulated miRNAs were identified.

In the present study, epigenetic mechanisms were identified to play a significant role in the down-regulation of miR-141 and miR-145 in cells of RCC. In addition, a strong methylation of the corresponding promoter regions was detected at a molecular level. In functional analyses a tumor suppressive effect of these two epigenetically regulated miRNAs on RCC cells was shown. In detail, miR-141 was able to inhibit proliferation, migration and invasion of RCC cells. miR-145 also had a decreasing effect on the migration of RCC cells. Furthermore, co-over-expression of both miRNAs resulted in a synergistic effect with increased inhibition of cell migration. By further investigations, TGFBR1 and SLC16A3 could be identified as specific targets of miR-141. BIRC2, CDH2, NRAS, SERPINE1, TLR4, TNFRSF10B, NRP2 and MAP4K4 were found as specific targets of miR-145. Additionally, both, miR-141 and miR-145 were identified as post-transcriptional regulators of the targets EAPP, TGFB2, VRK2, HS6ST2 and LOX. Here the two miRNAs again showed a synergistic effect, as demonstrated by a significantly increased inhibition of HS6ST2 and LOX expression after simultaneous over-expression of both miRNAs. In ccRCC tissue the expression of LOX and MAP4K4 was strongly enhanced on mRNA level compared to normal tissue. Moreover, LOX expression allowed not only to distinguish between normal and tumor tissue, but also between non-metastatic and already metastasized primary tumors. In the subsequent tissue microarray analysis of the protein expression, LOX and MAP4K4 showed a prognostic impact for the overall survival of patients with ccRCC.

These results illustrate a huge impact of epigenetically dysregulated miRNAs and of their specific targets on tumor-associated processes and draw attention to their crucial role in the tumorigenesis and progression of ccRCC with particular focus on metastasis. Furthermore, the network of epigenetics, miRNAs and their respective targets offer a number of diagnostic and prognostic capabilities, but also provides many opportunities for the development of new therapeutic strategies.

Zusammenfassung

Nierenzellkarzinome (RCC) repräsentieren etwa 3 % aller humanen malignen Tumore. Dabei weisen ca. 25 % der diagnostisierten RCCs bereits Metastasen auf. Aufgrund der schlechten Prognose des metastasierten RCC besteht ein dringender Bedarf an neuen Therapieformen sowie an prognostischen und diagnostischen Markern. microRNAs (miRNAs) bieten sich dabei als vielversprechende molekulare Biomarker an. Durch die posttranskriptionelle Regulation spezifischer Targets sind miRNAs in eine Reihe von biologischen Prozessen involviert und spielen eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Progression vieler Tumore. Dabei kann eine miRNA diverse Targets regulieren und die Expression eines Targets kann durch mehrere spezifische miRNAs gehemmt werden. Für den klarzelligen RCC-Subtypen (ccRCC), der etwa 70 % der RCCs ausmacht, wurde bereits ein umfangreiches miRNA-Expressionsprofil erstellt und somit die ccRCC-relevanten, vorwiegend herunterregulierten miRNAs identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Promotorbereiche der miR-141 und miR-145 in RCC-Zellen stark methyliert vorliegen und epigenetische Mechanismen maßgeblich an der Hemmung dieser beiden im ccRCC verringert exprimierten miRNAs beteiligt sind. In funktionellen Analysen wurde eine tumorsuppressive Wirkung dieser miRNAs auf RCC-Zellen nachgewiesen. Dabei war miR-141 in der Lage, die Proliferation, Migration und Invasion zu hemmen und auch miR-145 hatte einen inhibierenden Effekt auf das migratorische Verhalten. Des Weiteren kam es durch die gleichzeitige Überexpression der beiden miRNAs zu einer synergistischen Wirkung und so zu einer verstärkten Hemmung der Zellmigration. Weitere Untersuchungen konnten die spezifischen Targets TGFBR1 und SLC16A3 für miR-141 und BIRC2, CDH2, NRAS, SERPINE1, TLR4, TNFRSF10B, NRP2 und MAP4K4 für miR-145 identifizieren. Zudem wurden beide miRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren der Targets EAPP, TGFB2, VRK2, HS6ST2 und LOX bestimmt. Dabei zeigte sich wieder ein synergistischer Effekt, der sich in einer verstärkten Hemmung der Expression von HS6ST2 und LOX nach gleichzeitiger Überexpression der miRNAs äußerte. Die Targets LOX und MAP4K4 waren in ccRCC-Gewebe auf mRNA-Ebene stark überexprimiert im Vergleich zu Normalgewebe. Die LOX-Expression ermöglichte dabei sowohl eine Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorgewebe als auch zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Primärtumoren. Bei der anschließenden Tissue-Mikroarray-Analyse der Expression auf Proteinebene zeigte sich ein prognostisches Potenzial der Targets LOX und MAP4K4 für das Gesamtüberleben von ccRCC-Patienten.

Diese Daten verdeutlichen den enormen Einfluss von epigenetisch dysregulierten miRNAs und deren spezifischen Targets auf tumorassoziierte Prozesse und weisen auf deren entscheidende Rolle bei der Tumorgenese und speziell bei der Metastasierung des ccRCC hin. Zudem bietet das Netzwerk aus Epigenetik, miRNAs und deren jeweiligen Targets nicht nur eine Reihe von diagnostischen und prognostischen Möglichkeiten, sondern liefert auch viele Ansatzpunkte für die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien.

Eigene Publikationen

Publikationen

Liep J, Kilic E, Meyer HA, Busch J, Jung K, and Rabien A. MAP4K4 as target of miR-145-5p and its role in metastatic clear cell renal cell carcinoma. Pathobiology, submitted 2016.

Liep J, Kilic E, Meyer HA, Busch J, Jung K, and Rabien A. Cooperative Effect of miR-141-3p and miR-145-5p in the Regulation of Targets in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. PLOS ONE 2016.

Wotschofsky Z, Gummlich L, **Liep J**, Stephan C, Jung K, Billaud JN and Meyer HA. Integrated microRNA and mRNA signature associated with the transition from the locally confined to the metastasized clear cell renal cell carcinoma. PLOS ONE 2016;11(2).

Wotschofsky Z*, **Liep J***, Meyer HA, Jung M, Wagner I, Disch AC, Schaser KD, Melcher I, Kilic E, Busch J, Weikert S, Miller K, Erbersdobler A, Mollenkopf HJ, Jung K. Identification of metastamirs as metastasis-associated microRNAs in clear cell renal cell carcinomas. Int J Biol Sci 2012;8(10):1363-74. ***geteilte Erstautorenschaft**

Liep J, Rabien A, Jung K. Feedback networks between microRNAs and epigenetic modifications in urological tumors. Epigenetics 2012;7(4):315-25.

Vorträge/Poster

Liep J, Wotschofsky Z, Jung K. Epigenetically regulated miRNAs in clear cell renal cell carcinoma [Abstract P1.5: Urologe 2013;52:105-106]. 4.Symposium "Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie", Berlin, 08.-10.11.2012.

Liep J, Wotschofsky Z, Stephan C, Miller K, Jung K, Busch J. Epigenetically repressed miRNAs as predictors of tumor recurrence in clear cell renal cell carcinoma patients following radical nephrectomy. AUA 2013 Annual Meeting of the American Urological Association, San Diego, 04.-08.05.2013

Liep J, Wotschofsky Z, Jung K. Targets and function of dysregulated microRNAs in clear cell renal cell cancer [Abstract P1.6: Urologe 2014;53:111]. 5.Symposium "Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie", Gießen, 14.-16.11.2013

Liep J, Rabien A, Kilic E, Busch J, Jung K. Identification of targets of dysregulated microRNAs in clear cell renal cell carcinoma [Abstract P2.2: Urologe 2015;54:118]. 6.Symposium "Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie", Homburg, 13.-15.11.2014

Liep J, Rabien A, Kilic E, Busch J, Jung K. The role of epigenetically dysregulated microRNAs in clear cell renal cell carcinoma "Making walls history – Overcoming treatment barriers in Cancer" Conference, Berlin, 05.-06.06.2015

Liep J, Weickmann S, Jung K. Analytisch bedingte Distorsion von miRNA-Profilen als Ursache von Misserfolgen in der miRNA-Biomarker-Entwicklung. [Abstract V1.9: Urologe 2016] 7. Symposium "Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie", Dresden 19.-21.11.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	I
Zusammenfassung	II
Eigene Publikationen	III
1. Einleitung	1
1.1. Die Niere	1
1.1.1. Aufbau und Funktion der Niere	1
1.1.2. Das Nierenzellkarzinom	2
1.1.2.1. TNM-Klassifikation (Staging) und Differenzierungsgrad (Grading).....	3
1.1.2.2. Histologische Klassifikation	3
1.1.2.3. Diagnose, Prognose und Therapie	4
1.1.3. Molekularbiologie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	5
1.2. microRNAs	12
1.2.1. microRNA-Grundlagen	12
1.2.2. microRNAs in der Kanzerogenese	15
1.2.3. microRNAs im Nierenzellkarzinom	17
1.3. Zielsetzung.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.2. Oligonukleotide	21
2.1.3. microRNAs	21
2.1.4. Medien	22
2.1.5. Zelllinien, Bakterienkulturen und Vektoren	23
2.1.6. Patientenmaterial	23
2.1.7. Software-Programme.....	24
2.2. Methoden	25
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1.1. Isolierung genomischer DNA	25
2.2.1.2. Isolierung von Gesamt-RNA	25
2.2.1.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-/RNA-Lösungen.....	26
2.2.1.4. Bisulfidsequenzierung	26
2.2.1.5. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
2.2.1.6. Agarosegelelektrophorese	27
2.2.1.7. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	27
2.2.1.8. TOPO®TA-Klonierung und Transformation von One Shot®TOP10 E. coli	27
2.2.1.9. Mini-PCR	28
2.2.1.10. Plasmidisolierung aus E. coli	28
2.2.1.11. Restriktionsverdau.....	28
2.2.1.12. Sequenzierung	28
2.2.1.13. Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR).....	28
2.2.2. Zellbiologische Methoden	30
2.2.2.1. Kultivierung von humanen Zelllinien	30
2.2.2.2. Proliferationsassay (XTT-Test)	30
2.2.2.3. In-vitro-Demethylierung von DNA	31
2.2.2.4. Transiente Zelltransfektion	31
2.2.2.5. Wound-healing-Assay	32
2.2.2.6. Invasion-/Migrationsassay.....	32

2.2.3.	Immunhistochemische Methoden	32
2.2.4.	Statistische Auswertverfahren	33
3.	Ergebnisse	34
3.1.	Analytisch bedingte Verzerrungen von miRNA-Profilen	34
3.2.	Epigenetische Regulation von microRNAs in RCC-Zelllinien	38
3.2.1.	Selektion von herunterregulierten microRNAs	38
3.2.2.	Re-expression von microRNAs durch Hemmung epigenetischer Mechanismen	39
3.2.3.	Methylierungsstatus	43
3.3.	Funktionelle Bedeutung epigenetisch regulierter microRNAs in RCC-Zelllinien	46
3.3.1.	Überexpression von miR-141 und miR-145 in RCC-Zelllinien	46
3.3.2.	Funktionelle Untersuchungen der miR-141 und miR-145 in RCC-Zelllinien	47
3.4.	Targets epigenetisch regulierter microRNAs	50
3.4.1.	In-silico-Targetsuche	50
3.4.2.	Regulation ausgewählter Targets durch miR-141 und miR-145 in RCC-Zelllinien	51
3.4.3.	Expression und Korrelation der Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 und microRNAs miR-141 und miR-145 beim ccRCC	55
3.4.4.	Immunhistochemische Untersuchung von LOX und MAP4K4 an Gewebeschnitten des Nierenzellkarzinomes	61
4.	Diskussion	72
4.1.	Analytisch bedingte Verzerrungen von miRNA-Profilen	73
4.2.	Epigenetische Regulation von microRNAs	75
4.3.	Funktionelle Bedeutung von miR-141 und miR-145 im RCC	78
4.3.1.	Expression der miR-141 und miR-145	78
4.3.2.	Funktion der miR-141 und miR-145	79
4.4.	Lysyloxidase und MAP4K4 im Nierenzellkarzinom	87
4.4.1.	Lysyloxidase	87
4.4.2.	MAP4K4	91
4.5.	Schlussfolgerung und Ausblick	93
5.	Literaturverzeichnis	94
6.	Anhang	110
6.1.	Abbildungen und Tabellen	110
6.2.	Abbildungsverzeichnis	115
6.3.	Tabellenverzeichnis	116
6.4.	Verzeichnis der Gene	117
6.5.	Abkürzungsverzeichnis	118
6.6.	Danksagung	119
6.7.	Eidesstattliche Erklärung	120

1. Einleitung

1.1. Die Niere

1.1.1. Aufbau und Funktion der Niere

Die Nieren als harnbildende Organe sind für eine Reihe von lebenswichtigen Funktionen im menschlichen Organismus verantwortlich. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes. Durch die Filtration des Blutes durch die Nieren werden stickstoffhaltige Endprodukte aus dem Eiweißstoffwechsel (Harnstoff) ausgeschieden und das Blut somit entgiftet. Außerdem übernehmen die Nieren endokrine Funktionen zur Regulation des Blutdrucks und der Blutbildung (Pape et al. 2010).

Die Niere ist nach außen durch die Nierenkapsel abgegrenzt und verfügt über je einen arteriellen Zufluss und einen venösen Abfluss (Abbildung 1). Im Inneren lässt sich der Aufbau in Nierenrinde und Nierenmark unterteilen. In der Nierenrinde liegen die funktionellen Einheiten der Niere, die Nephron. Jede Niere verfügt über mehr als eine Millionen dieser Nephronen, die sich aus den Nierenkörperchen (Glomerulus + Kapsel) und dem Tubulussystem zusammensetzen (Abbildung 1). Hier wird das Blut durch ein Kapillarknäuel, das einen Glomerulus bildet, in die Bowmankapsel gepresst und das entstandene Filtrat (Primärharn) durch die Tubuli in Richtung Sammelrohr geleitet. Das Tubulussystem lässt sich morphologisch und funktionell in die Abschnitte proximale, intermediäre und distale Tubuli sowie das Sammelrohr unterteilen. Während der Passage durch dieses System entsteht aus dem Primärharn durch Resorption und Sekretion der Endharn. Dieser wird über die Nierenkelche, das Nierenbecken, den Harnleiter und die Harnblase schließlich ausgeschieden (Pape et al. 2010).

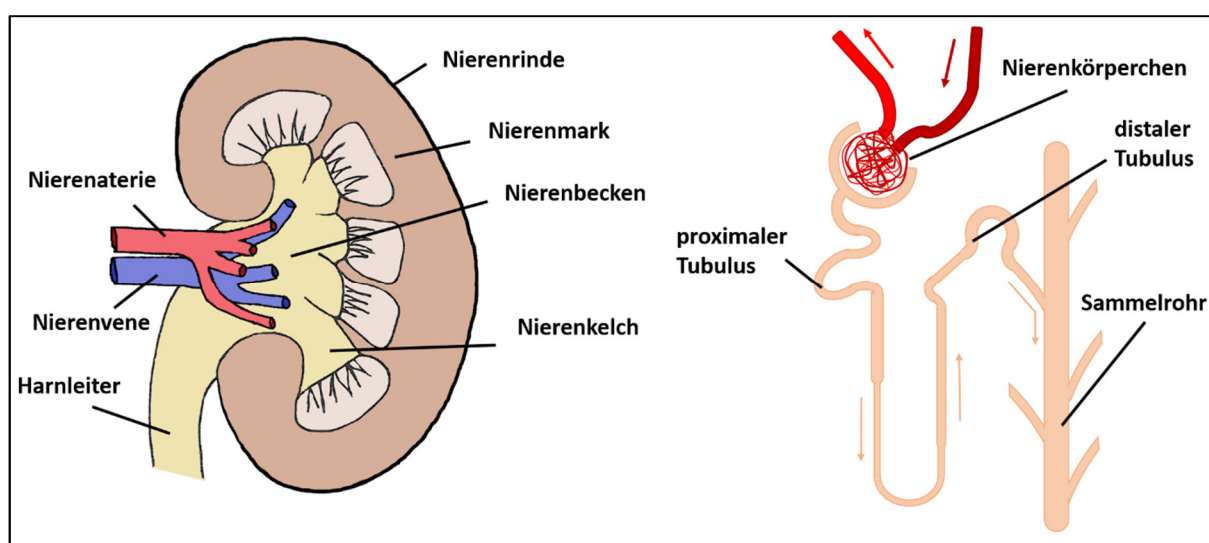


Abbildung 1. Aufbau und Funktion der Niere.

Schema der Niere sowie eines Nephrons als funktionelle Untereinheit.

1.1.2. Das Nierenzellkarzinom

Seit 1980 ist die Rate der Tumorerkrankungen in Deutschland deutlich angestiegen. Tumore der Niere zählen dabei sowohl bei Männern als auch bei Frauen zu den zehn am häufigsten auftretenden Tumoren (Robert Koch-Institut 2010) (Abbildung 2). Weltweit macht das Nierenzellkarzinom etwa 3 % aller Tumorerkrankungen aus, wobei die Inzidenz in den westlichen Industrieländern erheblich höher ist und zudem, aufgrund der sich verschiebenden Altersstruktur, in den letzten Jahren kontinuierlich anstieg (International Agency for Research on Cancer 2014). Während die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland bis auf aktuell etwa 15000 pro Jahr zugenommen hat, blieb die Sterberate mit etwa 5000 Fällen pro Jahr relativ konstant (Robert Koch-Institut 2013). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt etwa bei 70 Jahren, wobei Männer um das 1.5-Fache häufiger betroffen sind als Frauen (Ljungberg et al. 2015).

Maligne Neubildungen der Niere können von unterschiedlichen Gewebestrukturen ausgehen. Bei 80 - 90 % der Fälle handelt es sich um Nierenzellkarzinome (RCC), welche somit die häufigsten renalen Tumore bei Erwachsenen darstellen (Robert Koch-Institut 2010). Die übrigen ca. 10 % setzen sich aus Sarkomen, Lymphomen oder Nephroblastomen (Wilms-Tumoren), welche vorwiegend bei Kindern auftreten, zusammen.

Das Nierenzellkarzinom ist ein in erster Linie sporadisch auftretender Tumor. Als Risikofaktoren gelten Rauchen, Übergewicht, Bluthochdruck, chronische Niereninsuffizienz, sowie die Exposition mit Schadstoffen wie Teer oder Asbest (Laber 2006; Navai et al. 2012). Bei vergleichsweise wenigen Fällen (ca. 3 - 5 %) spielt auch eine familiäre Disposition eine Rolle (Pfaffenroth et al. 2008). Diese hereditären Nierentumore treten bei Patienten mit komplexen erblichen Syndromen wie dem von Hippel-Lindau-Syndrom, dem Birt-Hogg-Dubé-Syndrom, der familiäre Leiomyomatose, dem hereditären papillären Nierenzellkarzinom oder der Tuberösen Hirnsklerose auf. Hier kommt es bereits im frühen Lebensalter zur Bildung von Tumoren, die zudem oft bilateral und multifokal sind (Byler et al. 2014; Verine et al. 2010).

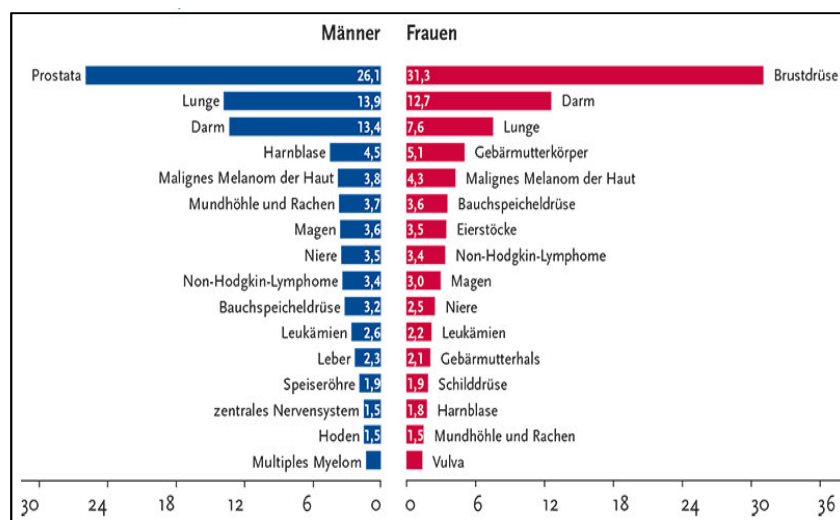


Abbildung 2. Krebsneuerkrankungen in Deutschland.

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanomischen Hautkrebs) (Robert Koch-Institut 2013).

1.1.2.1. TNM-Klassifikation (Staging) und Differenzierungsgrad (Grading)

Um Aussagen über die Prognose treffen zu können und den Therapieverlauf festzulegen, erfolgt die Diagnosestellung durch pathomorphologische Einteilung des Nierenzellkarzinoms nach der TNM-Klassifikation maligner Tumore der UICC und AJCC (Sobin et al. 2010). Bei dieser Beurteilung des Tumorstadiums werden örtliche Ausdehnung des Tumors (T), Lymphknotenbefall (N) und das Auftreten von Fernmetastasen (M) berücksichtigt und beurteilt. Eine weitere Einteilung des Nierenzellkarzinoms erfolgt nach dem Differenzierungsgrad, dem sog. Grading nach Fuhrmann und beruht auf dem Grad der Entdifferenzierung der Tumorzellen, d. h. wie sehr sich das Tumorgewebe bereits vom ursprünglichen Nierengewebe unterscheidet. Je höher der Grad der Entdifferenzierung ist, desto aggressiver ist der Tumor und desto schlechter stellt sich auch die Prognose für den Patienten dar (Fuhrman et al. 1982).

1.1.2.2. Histologische Klassifikation

Beim Nierenzellkarzinom handelt es sich histologisch gesehen um eine sehr heterogene Tumorentität. Da die Art des Tumors einen entscheidenden Einfluss auf das tumorspezifische Überleben hat, ist neben der TNM-Klassifikation und dem Grading die Einteilung des Tumors in histopathologische Subtypen von großer Bedeutung. Aufgrund neuer Erkenntnisse hat sich diese Einteilung in den letzten Jahrzehnten enorm verändert, wobei sich immer mehr Tumorentitäten durch morphologische, immunhistochemische oder molekularpathologische Merkmale unterscheiden lassen. Die Einteilung der einzelnen Subtypen wurde 2004 durch die WHO festgelegt (Eble et al. 2004) und 2013 durch die ISUP aktualisiert (Srigley et al. 2013). Die aus klinischer Sicht wichtigsten Subtypen sind das klarzellige Nierenzellkarzinom, das papilläre Nierenzellkarzinom und das chromophobe Nierenzellkarzinom.

Klarzelliges Nierenzellkarzinom

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC) entsteht vermutlich aus den proximalen Tubuli und macht etwa 70 % der Nierenzellkarzinome aus. Histopathologisch ist es durch helles, transparentes Zytoplasma charakterisiert (Jonasch et al. 2014). Bei etwa 60 - 90 % der sporadisch auftretenden ccRCC liegt ein Verlust oder eine Mutation des von Hippel-Lindau (VHL)-Gens vor. Neben dieser charakteristischen Veränderung sind oft auch die für die Chromatinstruktur verantwortliche Gene betroffen (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

Papilläres Nierenzellkarzinom

Der papilläre Subtyp entsteht vermutlich ebenfalls aus den proximalen Tubuli und tritt oft multifokal und/oder bilateral auf. Über ihn ist jedoch noch vergleichsweise wenig bekannt. Er macht nur 10 - 15 % der Nierenzellkarzinome aus und lässt sich in den basophilen Typ I und eosinophilen Typ II unterteilen, wobei Typ I die häufigere Variante ist (Byler et al. 2014; Merino et al. 2007).

Chromophobes Nierenzellkarzinom

Bei 4 - 5 % der Fälle von Nierenzellkarzinomen handelt es sich um ein chromophobes Nierenzellkarzinom, welches sich vom Sammelrohrsystem her ableitet. Die Prognose ist hier besser als bei den anderen Subtypen. Das chromophobe Nierenzellkarzinom ist häufig bei Patienten mit vererbbarem Birt-Hogg-Dube Syndrom in Verbindung mit einer Mutation des Tumorsuppressorgens BHD zu finden (Gad et al. 2007).

1.1.2.3. Diagnose, Prognose und Therapie

Im Frühstadium verursacht das Nierenzellkarzinom nur sehr selten Beschwerden. Symptome wie Flankenschmerzen, Hämaturie und tastbare Raumforderungen werden in der Regel nur bei fortgeschrittener Erkrankung beobachtet. In den meisten Fällen handelt es sich daher um Zufallsbefunde, z. B. bei Ultraschalluntersuchungen aus anderen Gründen (Ljungberg et al. 2015). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen 75 % der Patienten einen lokal begrenzten Tumor auf (Howlader et al. 2015). Etwa 20 - 30 % dieser Patienten entwickeln jedoch im postoperativen Verlauf lokale Rezidive oder Fernmetastasen. Bei 25 % der Patienten handelt es sich bereits bei der Erstdiagnose um ein fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom, bei dem z. T. regionale Metastasen oder Fernmetastasen vorliegen. Zur Diagnosestellung werden bildgebende Verfahren wie computertomographische bzw. magnetresonanztomographische Untersuchungen durchgeführt (Ljungberg et al. 2015). Geeignete molekulare Marker für die Diagnose und Prognose des Nierenzellkarzinoms stehen zurzeit jedoch noch nicht zur Verfügung.

Die Therapie ist abhängig vom Tumorstadium, aber auch vom Alter und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten. Üblicherweise erfolgt eine operative Tumoresektion, die heute möglichst organerhaltend durch Nierenteilresektion durchgeführt wird (Ljungberg et al. 2015). Für lokal begrenzte Nierentumore erfolgt dies mit kurativem Ziel. Bei metastasierten Nierenzellkarzinomen kann durch den chirurgischen Eingriff jedoch nur in sehr seltenen Fällen eine Heilung erzielt werden. Hier wird meist eine Resektion mit palliativer Absicht durchgeführt, gefolgt von einer systemischen Therapie (Ljungberg et al. 2015).

Die Prognose für Patienten mit Nierenzellkarzinom ist abhängig von anatomischen (Staging), histopathologischen (Subtyp, Grading), klinischen und molekularen Faktoren. Die 5-Jahres Überlebensrate für das Nierenzellkarzinom liegt in Deutschland bei etwa 75 % (Robert Koch-Institut 2010). Bei frühen Tumorstadien beträgt diese jedoch über 90 %. Der wichtigste limitierende Faktor für das Überleben ist das Vorliegen oder Auftreten von Fernmetastasen, welche sich vorwiegend in Lunge, Knochen, Leber oder Gehirn entwickeln (Dabestani et al. 2014). Die Überlebensdauer dieser Patienten beträgt im Schnitt nur etwa ein Jahr und lediglich 10 % überleben länger als 5 Jahre (Cohen et al. 2005). Durch den Einsatz neuer, zielgerichteter Medikamente wie Tyrosinkinaseinhibitoren und Angiogenesehemmer konnte in den letzten Jahren die Therapie des Nierenzellkarzinoms zwar allgemein verbessert werden, für Patienten mit metastasiertem klarzelligem Nierenzellkarzinom gilt jedoch immer noch die

schlechte Überlebensprognose von nur 1 - 2 Jahren (Thomas et al. 2015). Somit stellt das Nierenzellkarzinom nach wie vor eine ernsthafte Erkrankung dar, an der allein in Deutschland jährlich mehrere tausend Patienten versterben.

Auch wenn es mittlerweile eine Reihe therapeutischer Möglichkeiten gibt, kann bislang nur eine mehr als unbefriedigende Ansprechrate auf die aktuell verfügbaren Medikamente erzielt werden. Neben den oft erheblichen Nebenwirkungen der systemischen Therapie stellen Medikamentenresistenzen des Tumors, die z. T. schon primär vorhanden sind oder sich im Laufe der Therapie sekundär erst entwickeln, immer noch ein großes Problem dar (van der Mijn et al. 2014). In Anbetracht dessen ist die Identifizierung von molekularen Muster und Zielstrukturen nötig, um Tumore mit erhöhtem Metastasierungsrisiko zu erkennen und spezifische Substanzen für eine zielgerichtete Therapie mit geringeren Nebenwirkungen zu entwickeln.

1.1.3. Molekularbiologie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Klarzellige Nierenzellkarzinome sprechen stark unterschiedlich auf Therapien an (Shuch et al. 2015). Um die Prognose und den Therapieverlauf besser abschätzen zu können, ist es nötig, den Tumor auf molekularer Ebene besser zu charakterisieren. Die Tumorprogression ist jedoch ein komplexer mehrstufiger Prozess, der durch unterschiedliche genetische und epigenetische Veränderungen sowie durch die gegenseitige Interaktion zwischen Tumorzellen und der Mikroumgebung vorangetrieben wird (Hanahan et al. 2011). Von besonders großer Bedeutung für den klinischen Verlauf ist dabei der Übergang vom lokal begrenzten zum metastasierten Tumor. Einige der hierbei involvierten Gene und Mechanismen sind bereits bekannt und stellen sich als vielversprechende Marker vor (Sato et al. 2013).

Das charakteristischste Merkmal des ccRCC ist der frühe Verlust des Chromosomenarms 3p durch LOH (*loss of heterozygosity*), welcher bei über 90 % der ccRCC zu finden ist (Sato et al. 2013). In diesem chromosomalen Bereich sind eine Reihe wichtiger Gene wie *von Hippel-Lindau* (VHL), *Polybromo 1* (PBRM1), *SET domain-containing protein 2* (SETD2) und *BRCA1-associated protein 1* (BAP1) lokalisiert. Zudem liegt bei fast allen ccRCC Tumoren mit LOH des 3p-Arms eine zusätzliche Inaktivierung des verbleibenden VHL-Allels vor. Mutationen im zweiten Allel der anderen Gene sind dabei in wenigen Fällen und fast nur bei Patienten mit vollständig inaktiviertem VHL zu finden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei der VHL-Mutation um ein sehr frühes und entscheidendes Ereignis der Tumorentstehung handelt, das weitere Mutationen fördert und selektiert (Gerlinger et al. 2014; Sato et al. 2013). Im Folgenden soll eine Reihe von Prozessen aufgezeigt werden, die eine wichtige Rolle bei der Progression des ccRCCs spielen.

Epigenetische Veränderungen

Epigenetische Mechanismen spielen eine bedeutende Rolle bei Entwicklungsprozessen, der Aufrechterhaltung des spezifischen Genexpressionsprofils sowie bei der Entstehung und Progression von Tumoren. Es handelt sich hierbei um ein sehr komplexes, dynamisches System, bei dem durch das Zusammenspiel von reversiblen Veränderungen wie DNA-Methylierung und Histonmodifikation die Genexpression auf transkriptioneller Ebene fein reguliert wird (Feinberg et al. 2004).

Beim ccRCC sind häufig im gesamten Genom Veränderungen des DNA-Methylierungsprofils zu finden (Sato et al. 2013). Bei der DNA-Methylierung übertragen DNA-Methyltransferasen (DNMTs) Methylgruppen auf Cytosine in CpG-Sequenzen der DNA, welche meist in Clustern (CpG-Inseln) angeordnet sind. Etwa 60 % aller Promoterregionen von codierenden Genen beinhalten CpG-Inseln, die jedoch in den meisten Fällen unmethyliert vorliegen (Bird 2002). Kommt es durch physiologische oder pathologische Prozesse zur Methylierung solcher regulatorischen Bereiche, so kann dies einen starken Einfluss auf die Genexpression haben (Abbildung 3). Eine besonders wichtige Rolle spielt dabei die durch Hypermethylierung vermittelte Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die auch im ccRCC vielfach beobachtet wird. Ursache für Veränderungen im Methylierungsprofil sind vermutlich Mutationen in regulatorischen Genen. So wurde erst kürzlich entdeckt, dass die *α -ketoglutarate-dependent oxidase* (TET2), welche eine wichtige Rolle bei der DNA-Demethylierung spielt, in 16 % der ccRCC mutiert oder deletiert vorliegt (Sato et al. 2013). Teilt man ccRCC nach ihrem DNA-Methylierungsprofil von differenziell methylierten Genen in Subtypen ein, so zeigt der stark methylierte Typ einige charakteristische Veränderungen und korreliert mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Metastasierung sowie mit einer schlechteren Prognose für das Gesamtüberleben (Sato et al. 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

Sehr häufig sind in Tumorzellen, wie auch beim ccRCC, Veränderungen von Histonmarkern zu finden. Dabei lässt sich in vielen Fällen eine Assoziation zwischen bestimmten Mustern und dem Progressionsverlauf des Tumors nachweisen (Ramakrishnan et al. 2013a; Seligson et al. 2009). Das Chromatin bildet eine dynamische Struktur aus DNA und Histonen, die durch posttranslationale kovalente Modifikationen der Histonmoleküle (Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und ADP-Ribosylierung) oder über ATP-abhängige Remodeling-Komplexe verändert werden kann (Bhaumik et al. 2007; Khorasanizadeh 2004). Über diesen Mechanismus kann die transkriptionelle Aktivität des entsprechenden Genomabschnitts reguliert werden (Abbildung 3). Veränderungen in regulatorischen Komponenten spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des ccRCC. So handelt es sich auch bei den bereits genannten Genen PBRM1, SETD2 und BAP1 um wichtige Regulatoren der Chromatinstruktur (Brugarolas 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network 2013). PBRM1 ist nach VHL das am zweithäufigsten mutierte Gen beim ccRCC. Es codiert für eine Komponente des SWI/SNF-Komplexes, der am ATP-abhängigen Nukleosomen-Remodeling beteiligt ist. In etwa einem Drittel der ccRCC liegt PBRM1 selber mutiert vor. Nimmt man auch Veränderungen in anderen Komponenten des

Remodeling-Komplexes hinzu, so zeigen fast 60 % der Tumore Abweichungen in diesem Bereich (Sato et al. 2013). Die für SETD2 (Histonmethyltransferase) und BAP1 (Deubiquitinase) codierenden Gene sind jeweils in etwa 10 % der ccRCC somatisch mutiert, wobei das Vorliegen dieser Mutationen mit schlechterer Prognose für das Gesamtüberleben korreliert ist (Hakimi et al. 2013).

Aberrante Methylierungs- und Histonmarkerprofile scheinen also eine wichtige Rolle in der Tumorgenese des ccRCC zu spielen. In diagnostischer und prognostischer Hinsicht könnte die Identifikation von differenziellen Profilmustern zur Entwicklung von tumorspezifischen Biomarkern dienen. Epigenetische Veränderungen können aber auch als therapeutischer Ansatzpunkt von Bedeutung sein, da sie prinzipiell reversibel sind (Ganesan et al. 2009). So stellen demethylierende Substanzen, sowohl allein als auch in Kombination mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren, vielversprechende therapeutische Substanzen dar. Diese wurden in *in-vitro*- und in Xenograft-Versuchen bereits erfolgreich eingesetzt, um inhibierte Tumorsuppressorgene zu reaktivieren und so den Tumorprogress aufzuhalten (Brown et al. 2004; Hagiwara et al. 2008; Ramakrishnan et al. 2013b; Ricketts et al. 2013).

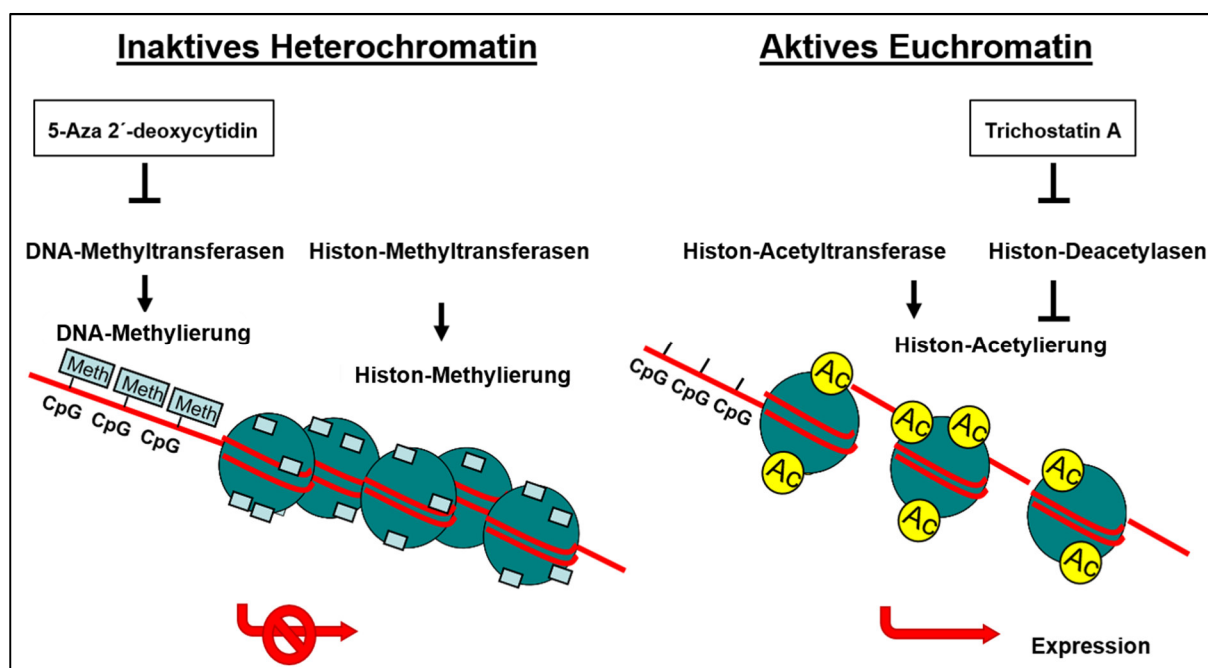


Abbildung 3. Epigenetische Regulation der Genexpression.

Die Regulation zwischen dem transkriptionell inaktiven Heterochromatin und dem aktiven Euchromatin wird durch epigenetische Mechanismen in Form von DNA-Methylierung und der Modifikation von Histonen durch Methylierung oder Acetylierung vermittelt. Abbildung angepasst nach Liep et al. 2012.

Hypoxie

Wie bei vielen anderen soliden Tumoren herrschen auch im RCC oft hypoxische Bedingungen vor. Dies hat einen starken Einfluss auf die Expression bestimmter Gene und kann die Progression hin zu einem aggressiven invasiven Phänotypen mit erhöhter Mikrogefäßdichte fördern (Vaupel et al. 2007). Eine zentrale Rolle bei der hypoxischen Antwort von Zellen spielt dabei der VHL/HIF-Signalweg. Nahezu alle ccRCC zeigen jedoch einen biallelischen Verlust von VHL durch Deletion (> 90 %) (Gnarra et al. 1994), Mutation (~ 50 %) (Gallou et al. 1999) oder Promotor-Hypermethylierung (5 - 10 %) (Herman et al. 1994). Unter Normalbedingungen sorgt VHL für den proteolytischen Abbau von HIF- α über die spezifische Erkennung durch einen Ubiquitin-Ligase-Komplex, bestehend aus VHL, Elongin B (TCEB2), Elongin C (TCEB1), einem RING-Finger Protein (RBX1) und Cullin 2 (CUL2) (Hsu 2012; Maxwell et al. 1999). Unter hypoxischen Bedingungen oder durch Verlust von VHL umgeht HIF- α jedoch diesen Abbau, sodass es zur Aktivierung des hypoxischen Signalwegs durch Induktion des HIF-Transkriptions-Komplexes und zur Expression der Downstream-Gene kommt. Die Erkenntnis, dass in 95 % der ccRCC VHL und/oder TCEB1 inaktiviert sind, verdeutlicht die kritische Rolle dieses Komplexes bei der Pathogenese des ccRCC (Sato et al. 2013).

Die durch HIF exprimierten Effektorgene sind an vielen tumorrelevanten Prozessen und Signalwegen wie Angiogenese (*vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet derived growth factor* (PDGF) (Rathmell et al. 2008)), Glucose-Metabolismus (GLUT1 (Singer et al. 2011)), Zellproliferation (Cyclin D1 (Bindra et al. 2002)), Überleben (TGF α , EGFR, c-MYC (de Paulsen et al. 2001; Franovic et al. 2007)) und Metastasierung (MUC1, Twist (Aubert et al. 2009; Yang et al. 2008)) beteiligt (Semenza 2010). Fehlt durch Inaktivierung des VHL-Komplexes, wie im ccRCC, der negative Regulationsmechanismus, so kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung des HIF-Komplexes und somit zu einer Überexpression der entsprechenden Zielgene (Abbildung 4). Eine besondere Stellung nehmen dabei die Angiogenese-fördernden Wachstumsfaktoren ein. So ist das Expressionsniveau von VEGF im ccRCC stark erhöht und korreliert mit der Mikrogefäßdichte (Kluger et al. 2008; Yang et al. 2015). Die Hemmung von VEGF oder dessen Rezeptor wird in der Klinik bereits als Therapieform angewendet (Ljungberg et al. 2015). Hier stellt jedoch das Auftreten von primären oder sekundär erworbenen Resistenzen der Tumore ein großes Problem dar (Mihaly et al. 2012).

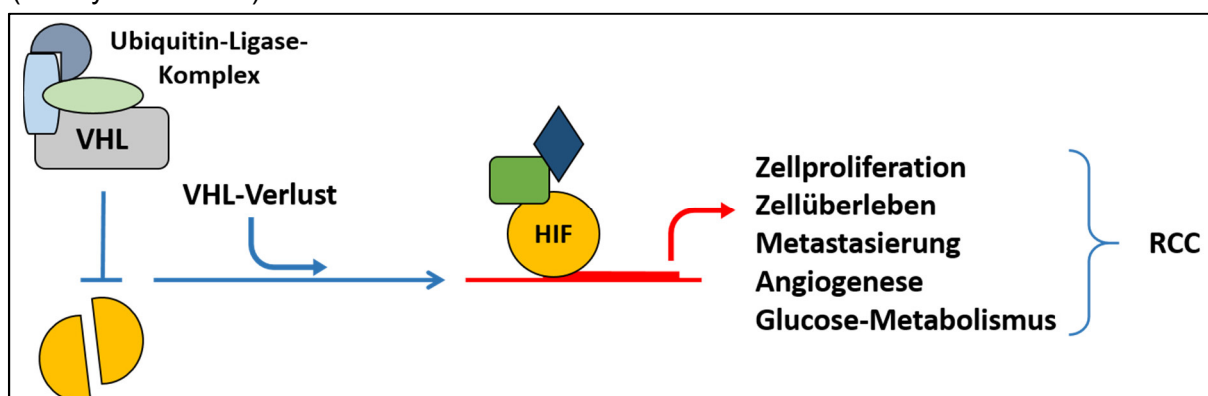


Abbildung 4. Hypoxie-Antwort durch VHL-Verlust im Nierenzellkarzinom.

Migration und Invasion

Das Auftreten von Metastasen ist ein entscheidendes Ereignis in der Tumorprogression des ccRCC. Essenziell für die Metastasierung sind dabei die Invasion in das umliegende Gewebe, das Überleben außerhalb des Primärtumors und schließlich das Wachstum im entfernten Organ (Steeg 2006) (Abbildung 5). Hierfür sind grundlegende molekulare und morphologische Veränderungen der Tumorzellen selber, aber auch der umliegenden Strukturen nötig.

Ein grundlegender Prozess, der die Metastasierung von Tumoren überhaupt ermöglicht, ist die morphologische Umwandlung von Zellen. Epitheliale und mesenchymale Zellen stammen von unterschiedlichen zellulären Entwicklungslinien ab. Epitheliale Zellen sind gut differenziert, besitzen eine apikal/baso-laterale Polung, verfügen über Adhäsionen zu anderen Zellen sowie zur Basalmembran und zeigen Zell-Kontakt-Inhibition. Mesenchymale Zellen zeigen dagegen Zell-Matrix-Assoziation, fokale Adhäsionen und Zellmotilität (Nantajit et al. 2015). Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschreibt einen Mechanismus, bei dem es zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts kommt, die Zell-Zell-Adhäsionsbeschränkungen überwunden werden und epitheliale Zellen durch molekulare und morphologische Veränderungen in einen migratorischen Phänotyp übergehen (Lamouille et al. 2014; Mikami et al. 2014) (Tabelle 1). EMT kann durch intrazelluläre Signale oder Stimuli aus der nahen Umgebung initiiert werden. Die Regulation wird dabei über die Transkription und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Snail, ZEB1/2 und Twist vermittelt (Lamouille et al. 2014). Diese bewirken eine transkriptionelle Hemmung von epithelialen Markern wie E-Cadherin (CDH1) und eine Förderung von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin (CDH2). Zudem sind Signalwege wie Wnt, Notch und Hedgehog daran beteiligt (Lamouille et al. 2014). Ein Weg, über den EMT ausgelöst werden kann, ist die hypoxische Zellantwort (Nantajit et al. 2015).

Aufgrund der konstitutiven Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs im ccRCC spielt EMT auch eine entscheidende Rolle bei der Progression dieser Tumore. So konnte eine Umschaltung im Genexpressionsprofil festgestellt werden, die den Veränderungen bei EMT entspricht (Chen et al. 2014a). Dabei scheint eine hohe Expression von Snail und eine niedrige Expression von E-Cadherin mit hochgradig entdifferenzierten („high-grade“) Tumoren und Metastasierung assoziiert zu sein (Cai 2013; Liu et al. 2015a). Zudem sind auch weitere mesenchymale Marker wie Twist, ZEB2, Vimentin und N-Cadherin im RCC erhöht und korrelieren mit klinischen Parametern und der Metastasierung (Fang et al. 2013; Harada et al. 2012; Tun et al. 2010).

Tabelle 1. Marker des epithelialen und mesenchymalen Phänotypen.

Phänotyp	Eigenschaften	Marker
epithelial	gut differenziert, apikal/baso-laterale Polung, Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Kontakt-Inhibition	E-Cadherin, Claudin, Occludin
mesenchymal	Zell-Matrix Assoziation, fokale Adhäsionen, Zellmotilität	Twist, Snail, ZEB1/2, N-Cadherin, β -Catenin, Vimentin, Fibronectin, Matrix Metalloproteinasen

Eine große Bedeutung für das Migrationspotenzial von Tumorzellen hat neben den zellulären Eigenschaften auch die unmittelbare Mikroumgebung. Hierzu gehört die Interaktion mit den umliegenden Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und inflammatorische Zellen, die Interaktion mit der extrazellulären Matrix (ECM, extracellular matrix [engl.]) sowie die Vaskularisierung des Gewebes (Goncalves et al. 2015). Die ECM bietet den Zellen ein strukturelles Gerüst zur Adhäsion und Migration und versorgt sie mit biochemischen Informationen aus der Umgebung. Das dynamische Grundgerüst der ECM besteht aus Polysacchariden und aus quervernetzten faserbildenden Proteinen wie Kollagen, Elastin, Integrin und Fibronektin und unterliegt einem ständigen Umbau (Bonnans et al. 2014). Der Aufbau und die Festigung der ECM erfolgen durch Synthese, Ablagerung und Vernetzung dieser Strukturproteine. Der Abbau wird durch eine Familie von Endopeptidasen vermittelt, den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (Chambers et al. 1997; Stamenkovic 2003). Es besteht dabei ein enger wechselseitiger Einfluss von Zellen und ECM, wobei die Bestandteile der ECM durch die Zellen sezerniert und modifiziert werden und die ECM ihrerseits die Zellen in Adhäsion, Migration und Proliferation beeinflusst (Alberts et al. 2008). Über Zell-Zell-Kontakte und Interaktion mit der ECM sowie durch Wachstumsfaktoren tauschen die Tumorzellen so ständig Informationen und Signale mit ihrer Umgebung aus. Veränderungen der ECM sind somit auch bei der Progression vieler Tumoren wie auch beim ccRCC, von zentraler Bedeutung (Jonasch et al. 2012). So zeigen RCCs häufig Abweichungen in der Expression und der Signaltransduktion von TGF- β , eines der Schlüsselzytokine bei der Regulation der ECM und der Signalübertragung zwischen ECM und Zellen (Bostrom et al. 2013; Cichon et al. 2014). Voraussetzungen für die Invasion von Tumorzellen ist die MMP-vermittelte proteolytische Modifikation der ECM. So exprimieren auch ccRCCs z. B. MMP-2 und MMP-9, die mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Prognose assoziiert sind (Cho et al. 2003; Yang et al. 2010).

Unter normalen Bedingungen bieten die Mikroumgebung und die ECM die geeigneten Voraussetzungen für eine normale Gewebeorganisation. Im Gegensatz dazu fördert die tumorassoziierte ECM maligne Zellproliferation und Motilität. Aufgrund von vermehrter Synthese oder Quervernetzung von Kollagen kann es zu verringerter Elastizität und zur Versteifung der ECM kommen (Frantz et al. 2010). Dies kann durch die erhöhte Zytoskelettspannung zur Veränderung der Zellpolarität, Zelladhäsion und der durch *Src tyrosine kinase* (Src)-vermittelten Bildung von Fokaladhäsionen führen (Frantz et al. 2010; Parsons et al. 2004; Playford et al. 2004). Der Verlust der Gewebemorphologie und der Zelldifferenzierung sowie eine Tumorprogression ist die Folge (Paszek et al. 2005). VHL ist ebenfalls an der ECM-Regulation beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von VHL wie beim ccRCC, zu einer Umstrukturierung der Matrix und so zu einem stark vaskularisierten und invasiven Tumor führen kann (Kurban et al. 2006).

Einmal an der Metastasierungsstelle angekommen, benötigen Tumorzellen eine geeignete Nische. So muss bereits vor dem Eintreffen der metastatischen Tumorzellen eine günstige Mikroumgebung im Zielorgan vorbereitet sein, um das Einwandern, das Überleben und die

Proliferation der ankommenden Tumorzellen zu ermöglichen (Kaplan et al. 2006a; Kaplan et al. 2006b). Die frühen Veränderungen zur Bereitung der prämetastatischen Nische werden vermutlich systemisch durch den primären Tumor in Form von löslichen Faktoren oder durch einzelne gestreute Tumorzellen vermittelt (McAllister et al. 2014). Diese Faktoren sind z. B. in der Lage, *bone marrow-derived cells* (BMDCs) zu stimulieren. Diese wandern an die zukünftige Metastasierungsstelle und sorgen für die Modifizierung der ECM, um geeignete Bedingungen für die Metastasenformierung vorzubereiten (Kaplan et al. 2005; Kaplan et al. 2006b). Es konnte auch gezeigt werden, dass durch eine Subpopulation von RCC-Zellen Mikrovesikel sekretiert werden, die in der Lage sind, Angiogenese zu fördern und die Bildung von prämetastatischen Nischen zu initiieren (Grange et al. 2011).

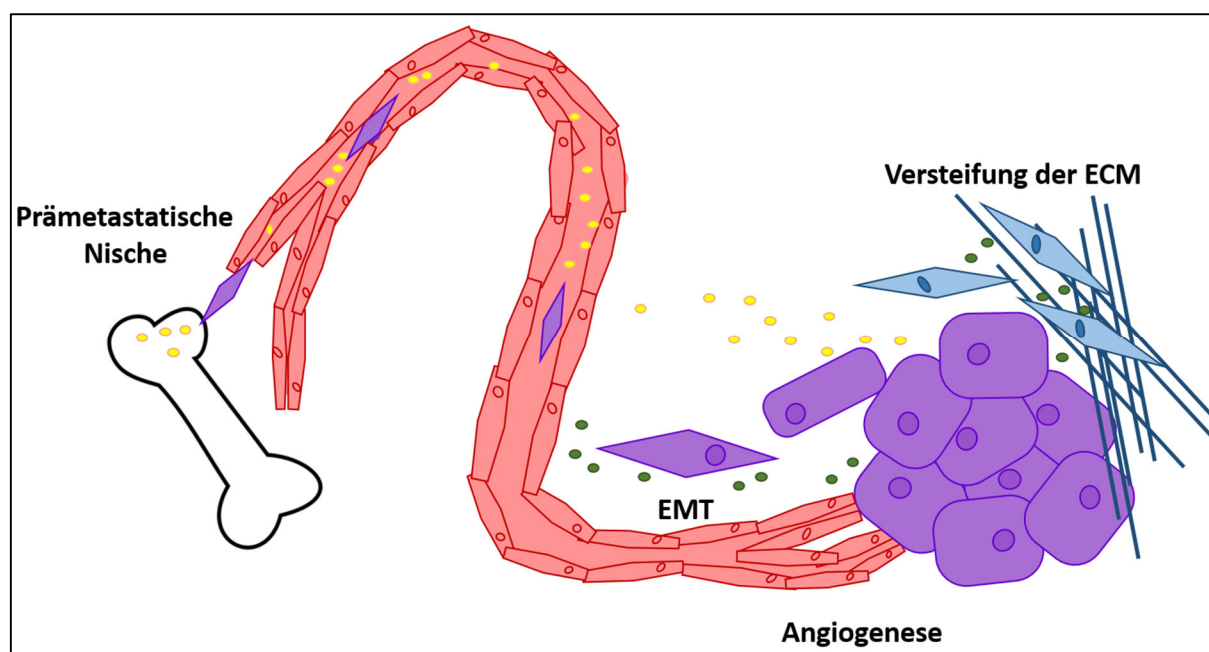


Abbildung 5. Metastasierung des Nierenzellkarzinoms.

Die Metastasierung des Nierenzellkarzinoms (lila) wird durch eine Reihe von Mechanismen vorangetrieben. Hierzu gehören die Versteifung der extrazellulären Matrix (blau), die Kommunikation (grün) mit den Zellen der Mikroumgebung wie Fibroblasten (hellblau) und Endothelzellen (rot), die Induktion von Angiogenese, die morphologische Veränderung durch EMT und die Bildung von prämetastatischen Nischen durch sekretierte Substanzen (gelb). ECM = Extrazelluläre Matrix; EMT = Epithelial-Mesenchymale Transition.

Für das lokal begrenzte Nierenzellkarzinom sind weiterhin Tumorstadium, -grading und -subtyp die wichtigsten Prognosefaktoren. Die häufigste Ursache für tumorassoziierte Todesfälle ist jedoch die Metastasierung. Aufgrund der Häufigkeit und des gravierend schlechteren Verlaufs des ccRCC bei Metastasierung ist gerade für das ccRCC die Identifikation des metastatischen Potenzials des Tumors von großer Bedeutung. Der enormen tumorbiologischen Variabilität muss jedoch noch größere Aufmerksamkeit gewidmet werden, um ein fundiertes Verständnis für die ablaufenden molekularen Prozesse bei der Entstehung, Progression und vor allem Metastasierung des Nierenzellkarzinoms zu entwickeln und um weitere mögliche prognostische Marker und therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

1.2. microRNAs

Etwa 65 % des humanen Genoms werden in RNA umgeschrieben, wobei es sich nur bei einem sehr geringen Anteil tatsächlich um Protein-codierende Transkripte handelt (Carninci et al. 2005). Der Rest wurde für eine lange Zeit als transkriptioneller Müll betrachtet. Erst in den letzten 10 - 15 Jahren wurde klar, welche große Bedeutung diesen kleinen Molekülen in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen zukommt. Zu den regulatorisch aktiven, nicht-codierenden RNAs gehören unter anderem small interfering RNAs (siRNAs), PIWI-interacting RNAs (piRNAs), long non-coding RNAs (lncRNAs), und microRNAs (miRNAs) (Naqvi et al. 2009).

1.2.1. microRNA-Grundlagen

Die miRNAs sind eine Klasse von kurzen, nicht-codierenden RNA-Molekülen mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden. Die ersten miRNAs, *lin-4* und *let-7* wurden in den Jahren 1993 und 2000 in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Carninci et al. 2005; Lee et al. 1993; Reinhart et al. 2000). Es wurde zunächst angenommen, dass es sich hierbei um eine Spezifität von Nematoden handelt. Die Entdeckung der ersten miRNAs in Vertebraten 2001 und die Erkenntnis, dass es sich hierbei doch um einen universellen Mechanismus handelt, löste schließlich eine große Welle von neuen Studien aus (Lagos-Quintana et al. 2001). Einen weiteren Hinweis für die große Bedeutung der miRNAs brachte die Beobachtung, dass miRNAs evolutionär über entfernte Spezies hinweg stark konserviert sind (Carrington et al. 2003). In der aktuell gültigen miRNA-Datenbank miRBase 21 werden mittlerweile 2588 reife humane miRNAs geführt (miRBase 2014).

microRNA-Biosynthese

microRNAs werden durch ihren eigenen Promotor abgelesen oder sind in Introns von codierenden Genen lokalisiert (Rodriguez et al. 2004). Grundsätzlich sind sie über das gesamte Genom verteilt, jedoch sind viele miRNAs auch in sogenannten Clustern in enger chromosomaler Nachbarschaft angeordnet. Sie werden oft gemeinsam transkribiert und zeigen somit ähnliche Expressionsprofile (Sun et al. 2013). Während viele miRNAs ubiquitär exprimiert werden, gibt es auch eine Reihe von miRNAs, die stark zell- oder gewebespezifisch sind. Die Synthese der miRNAs führt über einen komplexen Prozess zur Bildung der „reifen“ *mature* miRNA. Auch wenn einige Details noch unklar sind, ist der Prozess doch weitgehend bekannt und mehrfach beschrieben (Davis-Dusenbery et al. 2010; Schaefer et al. 2010b; Winter et al. 2011) und ist in Abbildung 6 vereinfacht dargestellt.

Die Biogenese beginnt mit der Transkription der sogenannten *primary* miRNA (pri-miRNA), welche meistens durch die RNA-Polymerase II synthetisiert wird. Dieses bis zu mehreren tausend Nukleotiden lange, primäre Transkript ist charakterisiert durch eine Haarnadelstruktur und verfügt wie mRNA Moleküle, über ein 5'cap und einen 3'poly(A)-Schwanz (Lee et al. 2004). Durch Spaltung mithilfe eines Komplexes, bestehend aus dem RNase III Enzym Drosha

und dessen Kofaktor, entsteht die etwa 70 Nukleotide lange *precursor* miRNA (pre-miRNA) (Lee et al. 2003). Diese wird nun aktiv über einen Ran-GTP/Exportin 5-vermittelten Mechanismus aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Hier findet ein weiterer Bearbeitungsschritt durch einen Komplex aus dem RNase III Enzym Dicer und dessen Kofaktoren statt, wobei der terminale Loop entfernt wird (Lee et al. 2002). Die entstandene kurze Doppelhelix miRNA:miRNA* wird schließlich entwunden und in zwei einzelsträngige *mature* miRNAs verarbeitet. Die reifen miRNAs liegen in der Zelle assoziiert mit Argonauten-Proteinen (Ago) im sogenannten miRISC Komplex (*miRNA-containing RNA-induced silencing complex*) vor (Hutvagner et al. 2002).

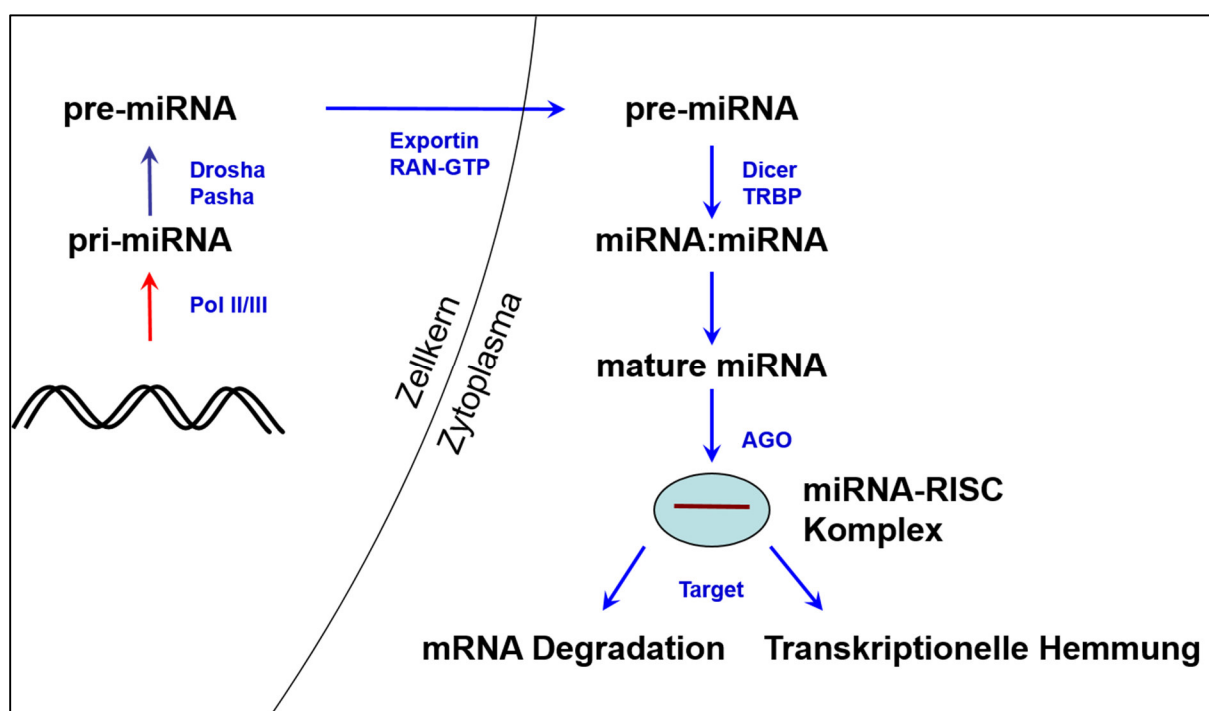


Abbildung 6. Biosyntheseweg der microRNAs.

Schema des Biosynthesewegs der microRNAs. Abbildung angepasst nach Liep et al. 2012.

microRNA-Datenbank und Nomenklatur

Seit 2002 existiert eine offizielle miRNA-Datenbank, die durch regelmäßige Updates (aktuell: Release 21, Juni 2014) eine unerlässliche Basis für die Arbeit mit miRNAs darstellt (miRBase 2014). Durch Deep-sequencing Technologien kommen ständig neue oder überarbeitete Daten hinzu, die regelmäßig in die Datenbank eingepflegt werden. Anhand der spezifischen und permanenten Accession-Nummer ist es jedoch immer möglich, die aktuellen und veränderten miRNA-Daten abzurufen und nachzuverfolgen.

Die Benennung von miRNAs erfolgt in zeitlicher Reihenfolge ihrer Beschreibung (z. B. hsa-miR-146a-3p). Die „Vorsilbe“ bezeichnet dabei den entsprechenden Organismus (z. B. hsa für *Homo sapiens*). Der Begriff „miR“ steht für die reife, also *mature* Sequenz. Nahe Verwandte miRNAs werden durch einen Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Durch den Zusatz -3p oder -5p wird angegeben, ob die miRNA aus dem jeweiligen 3'- oder 5'-Arm der pre-miRNA gebildet wird (miRBase 2014).

Posttranskriptionelle Regulation durch microRNAs

MiRNAs können die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene durch sequenzspezifische Interaktion mit mRNA-Molekülen regulieren. Die Erkennung der Ziel-mRNA durch den miRISC-Komplex erfolgt anhand der Komplementarität der *seed*-Sequenz (Nukleotide 2 - 8 des 5'-Endes) der miRNA zu einem spezifischen Motiv in der 3'UTR-Sequenz der mRNA (Doench et al. 2004). Der Grad der Komplementarität bestimmt dabei die nachfolgenden Prozesse. Während eine unvollkommene Basenpaarung lediglich eine Hemmung der Proteintranslation zur Folge hat, kann eine perfekte Komplementarität die Degradation der mRNA durch endonukleolytische Spaltung induzieren. Die Hemmung der Translation durch eine nur partielle Übereinstimmung kommt aber weit häufiger vor und wird durch die Blockierung des Initiationsschritts und eine Reduktion der mRNA-Stabilität vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass Komponenten des miRISC und der Ziel-mRNA vorwiegend in bestimmten Regionen des Zytoplasmas, den sogenannten P-bodies, lokalisiert sind, die letztendlich der mRNA-Abbauort zu sein scheinen (Liu et al. 2005).

microRNA-Targets

Die spezifischen Ziel-mRNAs der miRNAs werden als miRNA-Targets bezeichnet. Es wird angenommen, dass bis zu 60 % der humanen Protein-codierenden Gene durch miRNAs reguliert werden können (Friedman et al. 2009). Eine miRNA kann mehrere hundert unterschiedliche mRNAs regulieren. Eine mRNA kann dabei Target verschiedener miRNAs sein (Lim et al. 2005). Mitglieder einer miRNA-Familie sind in ihrer *seed*-Sequenz sehr ähnlich und können somit dieselbe Gruppe von Targets regulieren (Nozawa et al. 2010). Die primäre Aufgabe von miRNAs scheint die schnelle Feinanpassung der Genexpression zu sein. Durch das komplexe RNA-basierte Netzwerk kann bereits eine miRNA durch die Beeinflussung verschiedener Targets und Mediatoren eines Signalwegs einen starken physiologischen Effekt ausüben (Mendell et al. 2012). Durch die posttranskriptionelle Regulation von Genexpression sind miRNAs an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Zellzyklusregulation, Entwicklung, Differenzierung, Metabolismus und Alterung beteiligt (Boehm et al. 2006; Carleton et al. 2007; Garzon et al. 2006; Pasquinelli et al. 2005; Wang 2007). Um die genaue Funktion der einzelnen miRNAs zu verstehen, ist es nötig, ihre Targets zu identifizieren. Aufgrund der Komplexität der zugrunde liegenden Regeln stellt die sichere Vorhersage von möglichen Targets jedoch eine große Herausforderung dar. So müssen Algorithmen zur Vorhersage von miRNA-mRNA-Interaktionen neben der Sequenzkomplementarität auch Kriterien wie evolutionäre Konservierung der Sequenzen, Eigenschaften der mRNA-Bindestellen und deren unmittelbaren Umgebung sowie die thermodynamische Stabilität der gebildeten miRNA-mRNA-Duplex berücksichtigen. Beispiele für etablierte Algorithmen sind TargetScan (Grimson et al. 2007), miRanda (Betel et al. 2008), RNA22 (Miranda et al. 2006) und miRWalk (Dweep et al. 2011). Diese Datenbanken liefern z. T. eine Liste von mehreren hundert potenziellen Targettranskripten für eine miRNA. Da ihnen jedoch die nötige Sensitivität und Spezifität fehlt, ist eine Bestätigung durch experimentelle Analysen unerlässlich.

1.2.2. microRNAs in der Kanzerogenese

Das Expressionsmuster von miRNAs ist stark gewebespezifisch. Um dieses zu gewährleisten, ist eine präzise regulatorische Kontrolle ihrer Expression nötig. Aufgrund der entscheidenden Rolle von miRNAs in den unterschiedlichen Signalwegen kann eine Veränderung auf dieser Ebene erhebliche Auswirkungen auf das fein regulierte System haben. So werden bei vielen Erkrankungen Abweichungen im Expressionsprofil von miRNAs beobachtet. Im Jahr 2002 wurden miRNAs erstmals auch im Zusammenhang mit Tumoren beschrieben (Calin et al. 2002). Hierbei zeigten sich spezifische miRNA-Profile für unterschiedliche Tumorentitäten (Lu et al. 2005; Volinia et al. 2006). Aktuell (Dezember 2015) erhält man bei einer PubMed-Literatursuche mit den MeSH-Begriffen "MicroRNAs" AND "Neoplasms" eine erstaunliche Liste von 13318 Publikationen, die belegen, welche wichtige Rolle miRNAs in den einzelnen tumorrelevanten Prozessen wie Zellwachstum (Yu et al. 2014), Differenzierung (Nissan et al. 2011), Apoptose (Yu et al. 2010), Invasion (Yamasaki et al. 2013) und Metastasierung (Ma et al. 2010) zukommt. Veränderungen des miRNA-Expressionsprofils konnten mittlerweile in nahezu allen Tumoren beobachtet werden.

Grundsätzlich können miRNAs hoch oder herunter reguliert sein, wobei sich der Einfluss der dysregulierten miRNAs auf die Tumorgenese oder Tumorprogression durch vermehrte oder verringerte Hemmung ihres Targets auswirkt. Je nach Funktion des Targets kann eine miRNA daher als Onkogen oder als Tumorsuppressorgen fungieren, wie dies in Abbildung 7 schematisch dargestellt ist (Esquela-Kerscher et al. 2006). Da miRNAs jedoch oft viele Targets parallel regulieren und je nach Zelltyp unterschiedliche Wirkung zeigen, lassen sie sich nicht ohne Berücksichtigung des jeweiligen Kontextes einteilen (Garofalo et al. 2012).

Bereits 2005/2006 wurden die ersten miRNA-Profile von Tumoren erstellt, um das jeweilige miRNA-Expressionsmuster in einen Zusammenhang mit diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Parametern zu bringen (Bandres et al. 2006; Jiang et al. 2005). Die miRNA-Profile in malignen Geweben weisen dabei eine spezifische, breite Dysregulation im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe auf. Diese Untersuchungen machen das große Potenzial von miRNA-Profilen als Biomarker deutlich. Unabhängig von der Art des Tumors wird der Großteil der miRNAs verringert exprimiert (Lu et al. 2005). Ein Grund für diese globale Reduktion der miRNA-Expression in Tumoren sind möglicherweise Veränderungen im miRNA-Biogeneseweg. Einige Studien beschreiben eine Herunterregulation von Dicer und Drosha sowie eine damit verbundene schlechtere Prognose für den Patienten (Karube et al. 2005; Merritt et al. 2008). Außerdem wurde eine hemizygot Deletion des Dicer-Gens bei etwa 27 % der Tumore unterschiedlichen Ursprungs gefunden. Dies wird mit einer verringerten Gesamtexpression an miRNA in Verbindung gebracht (Kumar et al. 2009; Lambertz et al. 2010).

Neben der Modifikation des Biosyntheseweges können auch Abweichungen auf anderen regulatorischen Ebenen ursächlich für die veränderte miRNA-Expression oder -Aktivität sein. Auch wenn es zur Regulation der miRNAs im Einzelnen noch wenige Untersuchungen gibt,

konnten bereits eine Reihe von Mechanismen identifiziert werden, die miRNAs auf posttranskriptioneller Ebene beeinflussen. Dazu zählen die Interaktion mit RNA-bindenden Proteinen (RBPs), RNA-Editing sowie die Modulation von Stabilität und Abbau der miRNA (Adams et al. 2014). Des Weiteren existiert ein komplexes Netzwerk mit sogenannten *competing endogenous RNAs* (ceRNAs), das die Aktivität von reifen miRNAs beeinflusst (Adams et al. 2014). Eine sehr wichtige Komponente ist jedoch bereits die Regulation der Transkription. Der Großteil der miRNAs wird, wie bereits erwähnt, durch die RNA-Polymerase II transkribiert und unterliegt daher denselben regulatorischen Mechanismen wie mRNA-Transkripte. Zudem konnten groß angelegte Mapping-Studien in vielen miRNA-Promotoren vergleichbare regulatorische Einheiten wie TATA-Boxen, Histonmodifikationen und CpG-Inseln identifizieren (Corcoran et al. 2009; Ozsolak et al. 2008). Im Jahr 2006 wurde erstmals nachgewiesen, dass miRNA-Gene, analog zu Protein-codierenden Genen, durch epigenetische Mechanismen beeinflusst werden können (Saito et al. 2006a). Etwa 64 % der miRNA-Promotoren beinhalten innerhalb von 500 bp eine CpG-Insel und können somit durch veränderte DNA-Methylierungsmuster dieser Regionen beeinflusst werden (Ozsolak et al. 2008). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass Promotor-Hypermethylierung von miRNAs ein weit verbreiteter Prozess in der Tumorgenese ist, der zur Inaktivierung von tumorsuppressiven miRNAs und somit zur Überexpression des zugehörigen onkogenen Targets führt (Schiffgen et al. 2013; Wu et al. 2015). So konnte eine lange Liste von miRNAs identifiziert werden, welche verstärkt anfällig für epigenetisch bedingte Hemmung in Tumoren sind und deren Methylierungsstatus eng mit klinischen Daten assoziiert ist (Lujambio et al. 2008). Einen wesentlichen Teil der komplexen Wechselwirkung zwischen Epigenetik und miRNAs habe ich in Bezug auf die Thematik meiner Doktorarbeit bereits in einem Review für die Zeitschrift „Epigenetics“ zusammengestellt (Liep et al. 2012). Da die DNA-Methylierung, aber auch die Histonmodifikationen nachweislich eine entscheidende Rolle bei der Regulation von miRNA-Expression bei Tumoren spielen, könnte die epigenetische miRNA-Signatur als hilfreicher Biomarker für Diagnostik und Prognostik dienen. Aufgrund der Reversibilität dieser Modifikationen ist dies auch ein Ansatzpunkt zur Entwicklung von neuen therapeutischen Substanzen.

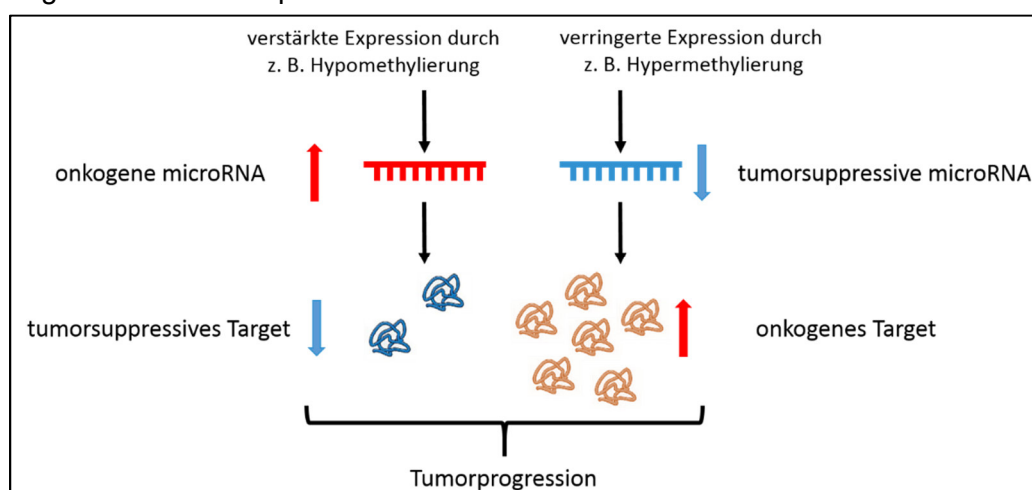


Abbildung 7. Epigenetische Regulation von microRNAs bei der Tumorgenese.

1.2.3. microRNAs im Nierenzellkarzinom

Auch an der Kanzerogenese von urologischen Tumoren sind dysregulierte miRNAs maßgeblich beteiligt (Patil et al. 2015; Schaefer et al. 2010b; Tolle et al. 2014). In den einzelnen Studien zeigten sich jedoch zum Teil unterschiedliche oder sogar widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Expression vieler miRNAs (Schaefer et al. 2010b). Ein großes Problem bei der Entwicklung neuer zuverlässiger Biomarker stellt die fehlende Vergleichbarkeit einzelner Studien dar, die vermutlich u. a. auf methodische Unterschiede zurückzuführen ist. Dies erschwert die Erkennung von geeigneten miRNAs enorm und ist mit ein Grund, warum miRNAs bisher nicht als Biomarker des RCC in die Klinik umgesetzt werden konnten.

Durch zahlreiche Studien konnte belegt werden, dass die veränderte Expression von einer Reihe von miRNAs eng mit der Diagnose und Prognose sowie mit dem Therapieverlauf von Patienten mit RCC assoziiert ist (Cheng et al. 2013; Gottardo et al. 2007; Heinzelmann et al. 2011; Jung et al. 2009; Silva-Santos et al. 2013; Wotschofsky et al. 2013). Einzelne Studien waren sogar in der Lage, ein verändertes miRNA-Profil auch im Blut von RCC-Patienten nachzuweisen (Redova et al. 2012; Teixeira et al. 2014). Ähnlich wie andere Tumorentitäten, zeigt auch das RCC vorwiegend eine Herunterregulation der miRNAs (Wotschofsky, Liep et al. 2012). Dabei konnten bereits in einigen Fällen epigenetische Mechanismen als Ursache für die Hemmung der Expression identifiziert werden (Schiffgen et al. 2013; Wu et al. 2015). Für manche der im Expressionsprofil gefundenen miRNAs ist zudem bereits bekannt, dass sie an der Regulation von Signalwegen beteiligt sind, die auch eine zentrale Rolle bei der Pathogenese des RCCs spielen. Dies gilt z. B. für die Hypoxie und die epitheliale-mesenchymale Transition (Wotschofsky, Liep et al. 2012).

Wie oben bereits beschrieben bestehen die größten Hürden beim Nierenzellkarzinom darin, dass es meist erst sehr spät erkannt wird und häufig Resistenzen gegenüber der angewendeten Therapie besteht oder sich entwickeln. Beide Faktoren resultieren jedoch aus dem Fehlen von geeigneten Biomarkern für die Diagnosestellung, für die Wahl der Therapieform aber und für die Überwachung des Krankheitsverlaufs. Hier könnte der Einsatz von validierten miRNA-Markern für das Management von Patienten mit RCC von großem Vorteil sein. Tumore könnten früher erkannt werden und die individuelle Charakterisierung des Tumors auf Basis von spezifischen miRNA-Expressionsmustern könnte als Grundlage zur Einschätzung des Rezidiv- und Progressionsrisikos herangezogen werden oder potenzielle Resistenzen gegenüber den Tyrosinkinase- oder Angiogeneseinhibitoren vorhersagen. Neue Erkenntnisse über die Regulation und funktionelle Rolle von dysregulierten miRNAs bei pathophysiologischen Prozessen des RCCs könnten aber auch wichtige Hinweise für die Identifizierung von weiteren Signalwegen oder Genen liefern, die potenzielle Biomarker oder Therapieziele wären. Wichtig für die Etablierung von robusten Biomarkern ist jedoch, für eine zuverlässige Vergleichbarkeit von Studienergebnissen zu sorgen und zudem die genaue Rolle, Regulation sowie Funktion von einzelnen miRNAs bei der Entstehung und Progression des RCCs zu untersuchen und zu verstehen.

1.3. Zielsetzung

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste maligne renale Tumor. Während durch die Resektion von lokal begrenzten Tumoren kurative Ergebnisse erzielt werden können, stellt die Behandlung von metastasierten Tumoren eine deutlich größere Herausforderung mit schwer abschätzbarer Langzeitprognose und schlechter Ansprechrate auf angewandte Therapien dar. Um diese Situation zu verbessern, ist es erforderlich, neue Biomarker zu etablieren und das Verständnis der ablaufenden Prozesse und ihre Zusammenhänge besser zu verstehen.

Die Klasse der miRNAs stellt in dieser Hinsicht ein vielversprechendes Forschungsgebiet dar. Zu Beginn dieser Arbeit lag von der eigenen Arbeitsgruppe bereits ein detailliertes miRNA-Profil des klarzelligen Nierenzellkarzinoms vor (Wotschofsky, Liep et al. 2012), das zahlreiche herunterregulierte miRNAs aufweist. Daraus leitete sich in Zusammenhang mit den erläuterten Besonderheiten der miRNA-Analytik und der wenig bekannten Regulation der miRNAs beim klarzelligen Nierenzellkarzinom folgende Aufgabenstellung ab:

1. In Vorversuchen sollte zunächst der Einfluss von unterschiedlichen RNA-Isolationstechniken auf die RNA-Qualität und methodisch-bedingter Verzerrungen auf nachfolgende Expressionsanalysen untersucht werden.
2. Um die mögliche epigenetische Beteiligung in Form von Hypermethylierung an der tumorassoziierten Hemmung der miRNAs beim Nierenzellkarzinom zu erfassen, die zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt war, sollte ein *in-vitro*-Demethylierungs-Assay an Zellkulturen etabliert und entsprechende Modellversuche durchgeführt werden. Durch Bisulfidsequenzierungen sollten die Daten verifiziert werden.
3. Im nachfolgenden Teil der Arbeit sollte die Funktion der epigenetisch regulierten miRNAs durch Transfektionsversuche in Zellkulturen genauer betrachtet werden, um die regulatorische Rolle dieser miRNAs bei tumorrelevanten Prozessen wie Proliferation, Migration und Invasion besser zu verstehen.
4. Ausgehend von den vorhergehenden Erkenntnissen war es das abschließende Ziel dieser Arbeit, Targets der epigenetisch regulierten miRNAs in der Zellkultur zu identifizieren und diese in einer Pilotstudie an einem Patientenkollektiv mittels RT-qPCR sowie auf Proteinebene zu bestätigen. Die Expressionsdaten sollten dazu mithilfe geeigneter statistischer Verfahren in Zusammenhang mit klinischen und histologischen Patientendaten gebracht werden, um daraus Schlussfolgerungen zum diagnostischen und prognostischen Potenzial ziehen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es somit, neben vorbereitenden methodischen Untersuchungen für die Herunterregulation von miRNAs im klarzelligen Nierenzellkarzinom die Methylierung als einen verantwortlichen epigenetischen Mechanismus näher zu untersuchen. Zudem sollte die funktionelle Bedeutung der inhibierten miRNAs sowie deren Targets identifiziert und charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Firma
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Deutschland
2301 Macrodrive 1 Power Supply	LKB, Bromma, Schweden
Agagel Mini	Biometra, Göttingen, Deutschland
Anthos htIII	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Antras 48 Laminar Flow Box	Cotech Vertrieb GmbH, Berlin, Deutschland
CaptairBio	Erlab, Val de Reuil, Frankreich
CB 210 Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Centrifuge 5403	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CoolPix 990	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Fluoroskan Ascent	Thermo Lab Systems, Langenselbold, Germany
Fusion SL	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Hoefer SemiPhor Transfer Unit	Amersham Pharmacia Biotech AB, San Francisco, CA, USA
IKA-Schüttler MTS 2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Julabo MP	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Leica DM2000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica MC170 HD	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leitz Fluovert Mikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
LightCycler 480	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
MiniSpin Centrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop ND-1000	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Power Pack P20	Biometra, Göttingen, Deutschland
Rotanta 420 R	Andreas Hettich GmbH Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Schüttel-Inkubator	Biometra, Göttingen, Deutschland
Sonopuls UW 2070	Bindelin Electronic GmbH Co KG, Berlin, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UNO Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
XCell SureLock	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Verbrauchsmaterialien	Firma
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
PCR-Platten	Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Corning Incorporated, NY, USA; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturgefäße	Corning Incorporated, NY, USA

Substanzen	Firma
5-Aza-2'-deoxycytidine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Antibody diluent	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Aquatex	Merck KgH, Darmstadt, Germany
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calcein AM	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DNA Molecular Weight Marker VIII	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Dulbecco's PBS	Gibco, Darmstadt, Deutschland
EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	J. T. Baker, Beventer, Holland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fluorescent Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Formaldehyd	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Gel Loading Solution	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hämalaun-Lösung	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland
HBSS	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck KgH, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Citrat	Merck KgH, Darmstadt, Deutschland
Protein Block	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Sigmafast Fast Red TR/Naphthol AS-MX	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris-Base	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Trizol Reagent	Ambion, Austin, USA
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Xylol	J. T. Beker, Beventer, Holland
Zitronensäure	Merck KgH, Darmstadt, Deutschland

Kits	Firma
AmpliTaQ Gold 360 Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
BD BioCoat™ Tumor Invasion System	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cell Proliferation Kit (XTT)	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Direct-zol RNA MiniPrep	Zymo Research, Irvine, USA
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
LightCycler 480 Probes Master	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
miRCURY RNA Isolation Kit – Cell and Plant	Exiqon, Vedbaek, Dänemark
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Ambion, Austin, USA
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan MicroRNA reverse transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TOPO TA Cloning	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland

Antikörper	Eigenschaften	Firma
anti-LOX (ab31238)	polyclonal, rabbit	Abcam, Cambridge, MA, USA
anti-MAP4K4 (sc-25738)	polyclonal, rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA
anti-rabbit (711-056-152)	polyclonal, donkey	Jackson, ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, USA

2.1.2. Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden mithilfe der Online-Programme Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) und Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) konzipiert und durch TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert (Tabelle 2, Tabelle 3, Anhang 1).

Die Primer/Sonden-Assays wurden auf der Roche Applied Sciences Homepage designet und die Universal Probe Library (UPL)-Sonden direkt von Roche Applied Sciences (Mannheim, Deutschland) bezogen. Zur Detektion von PPIA (Cyclophilin A) wurde ein mRNA-spezifischer QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Tabelle 2. Oligonukleotide zur mRNA-Expressionsanalyse und Assay-Informationen.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	System	Tm
MAP4K4	TGTGGAAGTCTATGCGTGGG	CCTCTGGCCTTCCTCAACAG	SYBR Green	61 °C
LOX	TGGCCGACCCCTACTACATC	ACATCTGCCCTGTATGCTGT	SYBR Green	59 °C
HS6ST2	TGCGATCTTCTCCAAGATTTTC	CGATCACGGCAAATAGGAAG	UPL #9	60 °C
PPIA	Hs_PPIA_1_SG QuantiTect Primer Assay			55 °C

Tabelle 3. Oligonukleotide zur Bisulfidsequenzierung und Assay-Informationen.

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm	Amplikon-Größe
bis-127-F	GAGGGTTTTGATTTAGAAAGATTAT	53 °C	197 bp
bis-127-R	CCCTACTACCTAAAAAATACTTCC		
bis-141-F1	GAGATTTTATTTGGTTTGTGGTTAG	52 °C	208 bp
bis-141-R1	TAATCCTCCATAATCTTCAAAACTC		
bis-141-F2	TAGGTAAAGGTTATTAGGGGAGAGG	55 °C	185 bp
bis-141-R2	ACCCAAATTACAATCCAAACAAA		
bis-145-F	AGGAGATTGGGAATATATATGAGT	52 °C	289 bp
bis-145-R	AAAAAATTCCTAAAAAACTAAACC		

2.1.3. microRNAs

TaqMan-Assays

Die zur Detektion der miRNAs verwendeten TaqMan-Assays, bestehend aus jeweils einem Primer für die reverse Transkription und einem für die quantitative Real-Time RT-qPCR mit TaqMan-Sonde, wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland; jetzt Thermo Fisher Scientific) bezogen (Tabelle 4, Tabelle 5, Anhang 2).

Tabelle 4. miRBase-Daten der microRNAs und Assay-ID des TaqMan® MicroRNA-Assays.

Name	Name miRBase 21	Accession # miRBase 21	Mature Sequence	Assay ID
miR-28	hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	000 411
miR-103	hsa-miR-103a-3p	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	000 439
miR-106a	hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	00 2169
miR-141	hsa-miR-141-3p	MIMAT0000432	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG	000463
miR-145	hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	GUCCAGUUUUCCCAGGAUCCCU	00 2278

Tabelle 5. Sequenz der RNUs und Assay-Information von Applied Biosystems®.

Name	Accession # NCBI	Sequence	Assay ID
RNU6B	NR_002752	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTT	001093
RNU48	NR_002745	GATGACCCCAGGTAACCTGAGTGTGTGCTGATGCCATCAC CGCAGCGCTCTGACC	001006

Synthetische microRNAs

Die synthetischen microRNAs mirVana™ miRNA mimic zur Transfektion in humane Zelllinien wurden von Applied Biosystems bezogen (Tabelle 6).

Tabelle 6. Synthetische microRNAs.

miRNA	Assay-Bezeichnung	Assay ID
miR-141-3p	miRVana™ miRNA mimic	MC10860
miR-145-5p	miRVana™ miRNA mimic	MC11480
NC#1	mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control #1	4464058

2.1.4. Medien

Medien	Eigenschaften	Firma
LB-Medium	LB Broth powder (20 g/l)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Agarplatten	LB Agar powder (35 g/l)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SOC-Medium		Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
McCoy's 5A	+ L-Glutamin	Gibco, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640	+ L-Glutamin	Gibco, Darmstadt, Deutschland
MEM	+ L-Glutamin / + 2.2 g/l NaHCO ₃	Biochrom, Berlin, Deutschland
Opti-MEM	+ L-Glutamin / + HEPES	Gibco, Darmstadt, Deutschland

Zusätze/Reagenzien	Eigenschaften	Firma
Ampicillin		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fetal Bovine Serum Gold		PAA, Pasching, Österreich
Glucose	100 g/l	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HEPES	1 M	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	100 mM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Non-essential amino acids	100x	Biochrom, Berlin, Deutschland
Pen/Strep	100x	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypanblaulösung	0.4 %	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA	0.5 % (10x)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Ultrapure X-Gal		Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Medium/Zusatz	Zelllinien					
	786-O	A498	ACHN	Caki-1	RT4	RT112
Medium	RPMI 1640	MEM	MEM	McCoy's	RPMI 1640	RPMI 1640
FKS	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
Pen/Strep	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Glucose	4.5 g/l					
HEPES	10 mM					
Natriumpyruvat	1 mM		1 mM			
NEAA			1x			

2.1.5. Zelllinien, Bakterienkulturen und Vektoren

Verwendet wurden die in Tabelle 7 genauer beschriebenen Nierentumorzelllinien sowie die beiden Blasenzelllinien RT4 und RT112. Die Zelllinien wurden von der ATCC (American Type Culture Collection) bzw. der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) bezogen (Tabelle 7). Im Laufe der Untersuchungen wurde eine Authentifizierung der Zelllinien durch die Firma Multiplexion (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt um eine mögliche Kontamination mit anderen Zellen auszuschließen.

Tabelle 7. Übersicht der verwendeten humanen Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung
786-O	Nierenzellkarzinomzelllinie, isoliert aus einem primären klarzelligen renalen Adenokarzinom eines 58-jährigen Patienten, adhärent wachsend mit epithelialer Morphologie.
A498	Nierenzellkarzinomzelllinie, isoliert aus dem Nierenzellkarzinom einer 52-jährigen Patientin, adhärent wachsend mit epithelialer Morphologie.
ACHN	Nierenzellkarzinomzelllinie, isoliert aus der Lungenmetastase (Pleuraerguss) eines 22-jährigen Patienten mit Adenokarzinom der Niere, adhärent wachsend mit epithelialer Morphologie.
Caki-1	Nierenzellkarzinomzelllinie, isoliert aus einer Hautmetastase eines 49-jährigen Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom, adhärent wachsend mit epithelialer Morphologie.

Bakterienstämme	Firma
OneShot®Top10 <i>E.coli</i> , chemisch kompetent	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Vektoren	Firma
pCR 2.1-TOPO	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.1.6. Patientenmaterial

Die Untersuchungen an humanem Gewebematerial erfolgte entsprechend den zustimmenden Voten der Ethikkommission der Charité (Nr. EA1/153/07 und EA1/153/12; „MicroRNAs als diagnostische und prognostische Marker in urologischen Tumoren“) im Rahmen der in der Forschungsabteilung der Klinik für Urologie laufenden Projekte. Für die Analysen auf RNA-Ebene wurde gefrorenes Frischgewebe verwendet, welches unmittelbar nach der Operation durch einen Pathologen beurteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C bis zur Analyse gelagert wurde. Für die histologischen Untersuchungen wurden archivierte Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeblöcke verwendet.

2.1.7. Software-Programme

Programm	Verwendung
Biogazelle qbasePLUS	Auswertung von RT-qPCR Daten
IBM SPSS Statistics 22	Statistische Auswertung
LightCycler®480SW1.5	Software für LightCycler®480
2100 Expert	Software für 2100 Bioanalyzer
MikroWin2000	Software für XTT-Test
ApE-A plasmid editor v2.0.47	Auswertung der Sequenzen
Ascent Software Version 2.4.2.	Software für Migrationsassay
MedCalc	Statistische Auswertung
ImageJ	Bildbearbeitung
Adobe Photoshop Elements 12	Bildbearbeitung
GraphPad Prism 5.04	Graphische und statistische Auswertung
MethTools Remote Analysis v1.2	Auswertung der Bisulfitsequenzierungen

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA aus Zellkulturen wurde mithilfe des QIAamp DNA Mini Kits den Herstellerangaben entsprechend isoliert. Hierfür wurden die Zellen geerntet und in einen Verdau mit QIAGEN Protease eingesetzt. Die DNA wurde anschließend über eine Säule isoliert, gereinigt und in H₂O eluiert. Die Eluate wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2. Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen und gefrorenem Frischgewebe wurde routinemäßig das miRNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Für die später beschriebenen Vergleichsuntersuchungen wurden vier zusätzliche Verfahren eingesetzt. Zellen wurden direkt lysiert. Das Frischgewebe wurde zunächst mit dem TissueLyser zerkleinert und anschließend lysiert. Um eine Verunreinigung durch DNA zu vermeiden, wurde bei den Isolationstechniken mit Säule ein DNase-Verdau durchgeführt. Die Lagerung der der Eluate erfolgte bei -80 °C. Die Kurzbeschreibung der fünf Isolierungsverfahren ist wie folgt:

miRNeasy (Qiagen)

Die Lyse erfolgte mit 700 µl Qiazol. Die RNA-Isolation wurde anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Zentrifugation durchgeführt. Die RNA wurde danach über eine Säule aufgereinigt und in 30 µl H₂O eluiert.

mirVana (Ambion)

Die Lyse wurde mit 600 µl Lysepuffer durchgeführt. Die RNA-Isolation wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, die RNA über eine Säule aufgereinigt und anschließend in 100 µl Elutionslösung eluiert.

miRCury (Exiqon)

Die Zellen bzw. das Gewebe wurden mit 350 µl Lysepuffer lysiert. Die RNA-Isolation erfolgte hier ohne Phasentrennung direkt über eine Säule. Nach Aufreinigung wurde die RNA mit 50 µl H₂O eluiert.

Trizol-Reagenz (nach Chomczynski)

Die Lyse wurde mit 700 µl TRIzol-Reagenz durchgeführt. Die Isolation erfolgte nach Chomczynski durch Phasentrennung ohne Aufreinigung über eine Säule (Chomczynski et al. 1987). Resuspendiert wurde die RNA anschließend mit 30 µl H₂O.

Direct-zol (Zymoresearch)

Die Lyse erfolgte mit 700 µl TRIzol-Reagenz. Ohne Phasentrennung wurde die RNA anschließend über eine Säule aufgereinigt und in 30 µl H₂O eluiert.

2.2.1.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-/RNA-Lösungen

Die Konzentration der isolierten RNA- und DNA-Proben wurde spektrofotometrisch am NanoDrop ND-1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit der Lösung wurde durch die Quotienten der optischen Dichten bei 260 nm zu 280 nm bzw. bei 260 nm zu 230 nm bewertet. Sollwerte für reine RNA-Lösungen sind hierbei > 1.8 für die Quotienten 260 nm zu 280 nm bzw. 2.0 für die Quotienten 260 nm zu 230 nm.

Die Integritätskontrolle der isolierten RNA-Proben und die Aufschlüsselung des small-RNA-Bereichs wurde am Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt. Für die weiteren Analysen wurden nur Proben mit einem RIN-Wert > 6 verwendet.

2.2.1.4. Bisulfitsequenzierung

Durch die Behandlung mit Bisulfit ist es möglich, den Methylierungsstatus einer DNA-Sequenz basengenau zu bestimmen (Abbildung 8). Durch die Inkubation der zu untersuchenden DNA kommt es zu einer Umwandlung von unmethylierten Cytosinen in Uracil, während methylierte Cytosine unverändert bleiben. Somit können einzelne methylierte Cytosine nachgewiesen werden. Die Bisulfit Konversion und die anschließende Aufreinigung der DNA erfolgte mithilfe des EpiTect®Bisulfite Kits den Herstellerangaben entsprechend.

Zur Analyse der Sequenz wurde das zu untersuchende Fragment anschließend mittels PCR amplifiziert, in einen pCR®2.1 Topo®-Vektor kloniert und sequenziert. Die entsprechenden spezifischen Primer für die Amplifikation von bisulfitierter DNA wurden mithilfe des Programms MethPrimer designet (Li et al. 2002) und über TIB Molbiol bezogen.

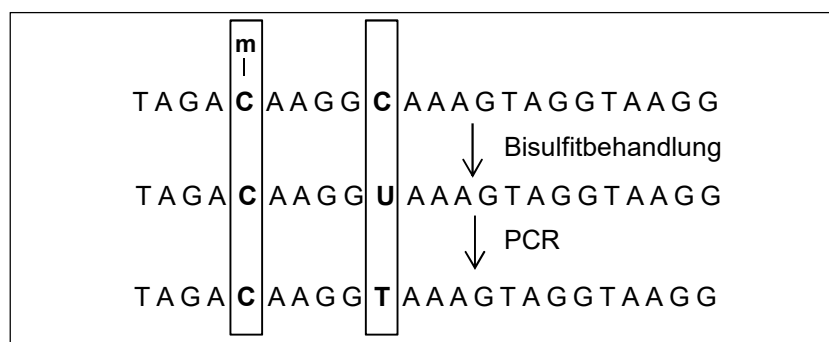


Abbildung 8. Schema zur Bisulfitsequenzierung.

2.2.1.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die zur Amplifikation angewendete Polymerasekettenreaktion wurde mithilfe des AmpliTaq Gold®360 Master Mix in einem Thermocycler durchgeführt. Hierfür wurde folgender PCR-Ansatz gemischt: 1x AmpliTaq Gold®360 Master Mix, 50 ng genomische DNA und jeweils 0.2 µM Forward- und Reverse-Primer. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler durch 10 min Aktivierung bei 95 °C, gefolgt von 35 Zyklen von 30 min Denaturierung bei 95 °C, 30 s Primerhybridisierung bei variabler Temperatur und 30 s Elongation bei 72 °C und abschließenden finalen Elongation bei 72 °C für 7 min.

2.2.1.6. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse von PCR- und Restriktionsverdau-Ansätzen wurde eine Elektrophorese mit 1.5 %igen Agarosegelen durchgeführt. Nach dem Aufkochen der Agerose wurde 0.05 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in eine Flachbettkammer gegossen. Die Proben wurden zunächst mit 5x Probenpuffer gemischt und die Taschen des vollständig erstarrten Gels mit einem Referenzmarker und den vorbereiteten Proben beladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 - 120 V durchgeführt. Das Bandenmuster konnte anschließend am Imager dokumentiert werden.

2.2.1.7. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von Restriktions- oder PCR-Ansätzen wurde die Bande des gewünschten DNA-Fragments bei möglichst geringer UV-Bestrahlung aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück aufgelöst. Anschließend konnte die DNA an eine Säule gebunden und nach mehreren Waschschritten mit 30 µl H₂O wieder von der Säule eluiert werden. Diese Methode wurde mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.8. TOPO®TA-Klonierung und Transformation von One Shot®TOP10 *E. coli*

Mit dem TOPO®TA System ist es möglich, ein frisch amplifiziertes PCR-Produkt direkt in einen Plasmid-Vektor zu subklonieren. Dieser linearisierte pCR®2.1 Topo®-Vektor enthält am 3'-Ende einen überhängenden T-Einzelstrang, an den kovalent eine Topoisomerase I gebunden ist. Die verwendete Taq-Polymerase verfügt über eine template-unabhängige Transferaseaktivität, wodurch dem PCR-Produkt einzelne Deoxyadenosine angehängt werden. Diese Sequenz kann an den T-Einzelstrang des Vektors binden und so in diesen eingebaut werden.

Hierfür wurde ein Reaktionsansatz aus 4 µl PCR-Produkt, 1 µl Salt Solution und 1 µl TOPO-Vektor vorbereitet, vorsichtig gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden 2 µl dieses TOPO-Klonierungsansatzes zur Transfomation von chemokompetenten *E. coli* Zellen (One Shot®TOP10) verwendet. Diese erfolgte durch 15 min Inkubation der *E. coli* mit dem Klonierungsansatz, 30 s Hitzeschock bei 42 °C und 2 min Abkühlen auf Eis, gefolgt von ca. 1 h Schütteln mit 250 µl SOC-Medium bei 37 °C. Von diesem Transformationsansatz wurden nun 40 - 200 µl auf eine Ampicillin-haltige [100 µg/ml] LB-Agar-Platte, die zuvor mit 20 µl X-Gal [40 µg/µl] zur Blau-Weiß-Selektion vorbehandelt wurde, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 einzelne Klone gepickt und jeweils eine 2.5 ml-Kultur mit LB-Medium [100 µg/ml Ampicillin] angeimpft.

2.2.1.9. Mini-PCR

Zur ersten Überprüfung, ob ein Bakterienklon über ein Plasmid mit dem gewünschten Insert verfügt, wurde eine Mini-PCR durchgeführt. Hierfür wurden Klone von einer LB-Platte gepickt und in 50 µl H₂O resuspendiert. Von dieser *E. coli*-Suspension wurden nun 3 µl in eine für das gesuchte Insert spezifische PCR eingesetzt. Im ersten Denaturierungsschritt platzen Bakterien auf, DNA wird freigesetzt und kann amplifiziert werden. Anhand eines Agarosegels konnte anschließend überprüft werden, ob das gesuchte Insert vorhanden war. Mit 30 µl der *E. coli* Suspension von positiven Klonen konnte direkt eine 2.5 ml-Bakterienkultur angeimpft werden.

2.2.1.10. Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Bakterien wurden dabei aufgeschlossen, Zellbestandteile abzentrifugiert und die Plasmid-DNA über eine Säule aufgereinigt.

2.2.1.11. Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob ein Plasmid ein gewünschtes Insert enthält, wurde ein Kontrollverdau mit EcoRI, dessen Schnittstellen das entsprechende Insert flankieren, durchgeführt. Hierfür wurde ein 20 µl-Reaktionsansatz aus 2 µl Puffer [10x], 1 µl EcoRI [20 U/µl], 5 µl Plasmid der Mini-Prep und 2 µl H₂O vorbereitet und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde in der Agarosegelelektrophorese überprüft, ob das jeweilige Insert vorhanden war und herausgeschnitten werden konnte.

2.2.1.12. Sequenzierung

Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) und wurden mithilfe der Programme ApE - A plasmid editor ausgewertet.

2.2.1.13. Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

Die relative Expression von miRNA bzw. mRNA wurde durch quantitative Real-Time „reverse transcription“ PCR (RT-qPCR) ermittelt. Diese wurde am LightCycler 480 auf 96-Well-Platten durchgeführt. Die Proben wurden in Duplikaten bzw. Triplikaten gemessen und jeweils eine No-Template- sowie bei Bedarf eine Interrun-Kontrolle mitgeführt.

Quantifizierung relativer miRNA-Expressionen

Die miRNA-Expressionen wurden mit TaqMan®microRNA Assays bestimmt. Durch die hier verwendeten miRNA-spezifischen stem-loop reverse transcription Primer kommt es zu einer Verlängerung des 3'-Ende, wodurch eine spezifischere Detektion der ansonsten sehr kurzen reifen miRNA in der RT-qPCR ermöglicht wird.

Für die reverse Transkription wurde das TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit verwendet und folgender 10 µl-Ansatz gemischt: 1 µl Gesamt-RNA [6.67 ng/µl], 0.1 µl dNTPs [100 nM], 0.67 µl MultiScribe RT Enzym [50 U/µl], 1 µl RT Puffer [10x], 0.13 µl RNase-Inhibitor [20 U/µl] und 1 µl spezifische RT-Primer [10x]. Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend im Thermocycler durch 30 min Primerhybridisierung bei 16 °C, 30 min Elongation bei 42 °C und 5 min Inaktivierung bei 85 °C.

Für die RT-qPCR wurden 5 µl TaqMan®Universal PCR Master Mix [2x] mit 0.5 µl des spezifischen TM-Primer [20x] und 1 µl der cDNA in einem Volumen von 10 µl eingesetzt. Die Detektion erfolgte im LightCycler 480 durch 10 min Aktivierung bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen von 15 s Denaturierung bei 95 °C und 1 min Primerhybridisierung/Elongation bei 60 °C und einer abschließenden Kühlung von 1 min bei 40 °C.

Quantifizierung relativer mRNA-Expression

Zur Ermittlung der mRNA-Expression wurde Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Für die Detektion wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche RT-qPCR-Systeme verwendet. Bei SYBR-Green handelt es sich um einen reversibel interkalierenden Farbstoff. Außerdem wurden targetspezifische UPL-Sonden verwendet, die eine Fluoreszenzmarkierung und einen Quencher aufweisen. Durch spezifische Amplifikation der Target-mRNA kommt es zur Abspaltung des Quenchers und das Signal des Fluoreszenzfarbstoffs kann detektiert werden.

Für die reverse Transkription wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Hierfür wurde Gesamt-RNA in folgendem 13 µl-Ansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert: 0.5 - 1 µl Gesamt-RNA [1 µg/µl], 1 µl Anchored-oligo (dT)18 Primer [50 µM] und 1 µl Random Hexamer Primer [600 µM]. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden 7 µl des Master Mixes bestehen aus 4 µl Transcriptor RT Reaction Buffer [5x], 0.5 µl Protector RNase-Inhibitor [40 U/µl], 2 µl dNTPs [10 mM each] und 0.5 µl RT Transcriptase [20 U/µl] zugegeben und die RNA im Thermocycler durch 10 min Primerhybridisierung bei 25 °C, 30 - 60 min Elongation bei 55 °C und abschließender 5 min Inaktivierung bei 85 °C umgeschrieben.

Zur relativen Quantifizierung von mRNA mit SYBR-Green wurde der 10 µl-Ansatz aus 5 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [2x], 1 µl cDNA und jeweils 1 µl Forward- und Reverse-Primer [2.5 µM] gemischt. Die Reaktion im LightCycler 480 wurde durch 15 min Aktivierung bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen von 15 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Primerhybridisierung bei variabler Temperatur und 30 s Elongation bei 72 °C durchgeführt. Um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Schmelzkurve aufgenommen. Zur relativen Quantifizierung von mRNA mit UPL-Sonden wurde der LightCycler 480 Probes Master verwendet und folgender 10 µl-Ansatz gemessen: 1 µl cDNA, 5 µl LightCycler 480 Probes Master [2x], 1 µl UPL-Sonde [1 µM] und jeweils 1 µl Forward- und Reverse-Primer [2.5 µM]. Die Detektion erfolgte durch 10 min Aktivierung bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen von 10 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primerhybridisierung bei 60 °C und 1 s Elongation bei 72 °C und einer abschließenden Kühlung von 1 min auf 40 °C.

Auswertung

Als Referenzgene für die miRNA-Expressionsdaten aus Zelllinien wurden die small nuclear RNAs RNU6B und RNU48 verwendet. Für die Expressionsdaten aus Nierengewebe wurde auf die miRNA-28-5p, -103-3p und -106a-5p normalisiert (Wotschovsky et al. 2011). Als Referenzgen für die mRNA-Expression in Nierengewebe sowie in Nierenzelllinien wurde die Expression von PPIA (Jung et al. 2007) in den einzelnen Proben bestimmt.

Die Auswertung der RT-qPCR-Daten erfolgte anhand der Software Biogazelle qbasePLUS. Mit dieser kann unter Berücksichtigung der spezifischen Effizienz, des jeweiligen Referenzgens und der Interrun-Kontrolle aus den Cq-Werten ein fiktiver Expressionswert CNRQ (Calibrated Normalized Relative Quantities) errechnet werden.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Kultivierung von humanen Zelllinien

Für die *in-vitro*-Untersuchungen wurden Zellkulturexperimente mit den in Tabelle 7 beschriebenen Zelllinien durchgeführt. Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen im jeweiligen serumhaltigen Wachstumsmedium unter Zugabe von Penicillin/Streptomycin. Inkubiert wurden die Zellkulturen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und H₂O-gesättigter Atmosphäre. Passagieren, Auftauen, Einfrieren, Zählen und Ausbringen der Zellen erfolgte nach Standardprotokollen. Die Zellen wurden nach dem Erreichen einer ca. 80 - 90 %igen Konfluenz passagiert. Das Ablösen der adhärennten Zellen erfolgte durch eine ca. 3-minütige Inkubation bei 37 °C in einer Trypsin/EDTA-Lösung. Durch die Zugabe von frischem Zellkulturmedium wurde die Reaktion wieder abgestoppt und das Trypsin durch Abzentrifugieren (4 min; 300x g) wieder entfernt. Zur Langzeitaufbewahrung wurden Kryostocks in 1 ml Einfriermedium (Wachstumsmedium mit 5 - 7.5 % DMSO) angelegt.

2.2.2.2. Proliferationsassay (XTT-Test)

Die Zellproliferation wurde mit einem XTT-Test fotometrisch bestimmt. Dieser Test basiert auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliums Salzes XTT in den orangenen Formazan-Farbstoff durch metabolisch aktive Zellen, wodurch der Einfluss unterschiedlicher Behandlungen auf die Zellproliferation und -vitalität untersucht werden kann.

Hierfür wurden Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und am folgenden Tag mit der jeweiligen Behandlung/Transfektion in Vier- bis Zehnfachbestimmung begonnen. Für die jeweilige Endpunktmessung wurden nach Angaben des Herstellers 50 µl XTT-Reagenz in die 100 µl Medium jedes Wells gegeben und für 4 h inkubiert. Anschließend erfolgte die fotometrische Messung bei einer Wellenlänge von 450 - 500 nm mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm.

2.2.2.3. *In-vitro*-Demethylierung von DNA

Für die Demethylierungsversuche wurden Zelllinien mit dem Cytidin-Derivat 5-Aza 2'-deoxycytidin (Aza) behandelt. Dieses wird bei der Zellteilung in die DNA eingebaut und verhindert deren Methylierung. Des Weiteren wurde der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet. Die Behandlung erfolgte entsprechend dem Schema in Abbildung 9 für 72 h mit Aza [1 μ M] bzw. 72 h mit Aza [1 μ M] und 24 h mit TSA [100 nM], wobei während der Inkubationszeit mit Aza das Medium alle 24 h erneuert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und die Expression durch RT-qPCR ermittelt.

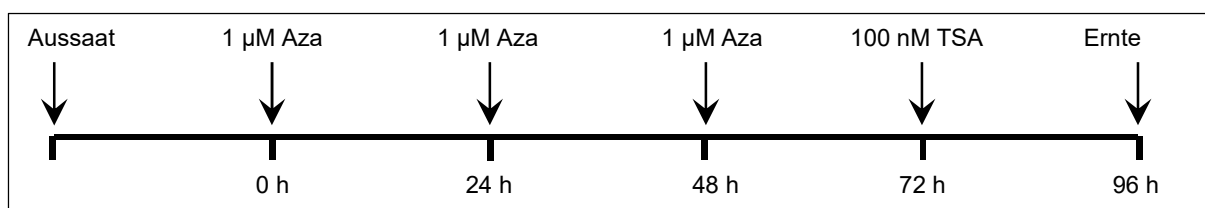


Abbildung 9 Schema zur *in-vitro*-Demethylierung.

2.2.2.4. Transiente Zelltransfektion

Etablierung der Transfektion

Die Etablierung der Transfektion erfolgte über die FAMTM-labeled Pre-miRTM NC#1. Hierbei handelt es sich um Fluoreszenz-markierte doppelsträngige RNA-Moleküle, mit deren Hilfe die Aufnahme von synthetischen miRNAs durch die Zellen überprüft werden kann. Die Zellen wurden in Kammer-Objektträger (chamber slides) ausgebracht und die Transfektion mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lipofectamine®2000 und FAMTM-labeled Pre-miRTM NC#1 durchgeführt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 20 min bei RT mit 3 % Formaldehyd fixiert und die Zellkerne für 5 min mit 4 μ g/ml Bisbenzimid gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckt und die Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop bewertet.

Transiente Zelltransfektion mit synthetischen miRNAs

Um die Überexpression der miRNAs zu simulieren, wurden die jeweiligen synthetischen RNA-Moleküle mirVanaTMmiRNA mimic mithilfe von Lipfectamine® 2000 in die Zelllinien eingebracht. Die Transfektion erfolgte 24 h nach Ausbringen der Zellen in entsprechenden Zellkulturplatten mit 30 nM mimic bzw. NC#1. Die synthetischen miRNAs sowie das Transfektionsreagenz [9 μ l pro 6-Well] wurden zunächst einzeln mit Opti-MEM vorverdünnt und dann zusammengeführt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz für 5 min bei RT inkubiert und vorsichtig in das Medium über den Zellen gegeben. Nach 6 h wurde die Hälfte des Mediums gewechselt und nach weiteren 18 h wurde nochmals das gesamte Medium gewechselt.

2.2.2.5. Wound-healing-Assay

Um die Migrationseigenschaften von unterschiedlich behandelten Zelllinien zu vergleichen, wurde ein Wound-healing-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach Transfektion in 6-Well-Platten kultiviert. Nach Erreichen eines nahezu konfluenten Zellrasens wurden mit einer Pipettenspitze jeweils zwei Spalten in diesen gezogen. Anschließend wurde die Migration in den Spalt zu unterschiedlichen Zeitpunkten photographisch festgehalten. Die Auswertung erfolgte durch Vermessung der noch freien Fläche des Spalts mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ.

2.2.2.6. Invasion-/Migrationsassay

Zur Untersuchung des Migrations- und Invasionsverhaltens von Zelllinien wurde das BD BioCoat™ Tumor Invasion System nach Herstellerangaben verwendet. Bei diesem Transwell-Assay wurden BD Falcon HTS FluoroBlok 24-Multiwell Insert Plates mit einer Porengröße von 8 µm verwendet. Zur Analyse des migratorischen Potenzials wurden unbeschichtete und für die Analyse der Invasion mit Matrigel beschichtete Inserts verwendet. In den unteren Kammern wurde jeweils Medium mit 5 % FKS vorgelegt und die zu untersuchenden Zellen in die oberen Insertkammern in Medium ohne FKS ausgesät. Während der Inkubationszeit von etwa 20 h bei 37 °C und 5 % CO₂ hatten die Zellen die Möglichkeit, in Richtung des Serumgradienten durch die Membran zu wandern. Die Quantifizierung der migrierten bzw. der invasiven Zellen an der Unterseite der Insertmembran erfolgte durch 1 h Inkubation mit 4 µg/µl des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein in HBSS und anschließender Messung am Mikrotiterplattenfotometer Fluoreskan Ascent.

2.2.3. Immunhistochemische Methoden

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in humanem Gewebe wurden immunhistochemische Färbungen an Schnitten von archivierten, Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben durchgeführt. Hierfür wurden ca. 4 µm dicke Paraffinschnitte auf einen Objektträger aufgebracht und für 4 h bei 60 °C im Wärmeschrank getrocknet.

Immunhistochemie

Zur Vorbereitung der Schnitte wurden diese zunächst durch Xylol-Inkubation für 15 min und absteigender Ethanolreihe (von absoluten Ethanol über 96 %, 80 % und 70 % zu Aqua bidest.) entparaffiniert. Zur Antigendemaskierung (Antigen-Retrieval) und um endogene alkalische Phosphatasen zu zerstören, wurden die entparaffinierten Schnitte unter Druck für den anti-LOX Primärantikörper in EDTA- (EDTA [1 mM], pH 8) oder für den anti-MAP4K4 Primärantikörper in Citrat-Puffer (Zitronensäure [2 mM], Natrium-Citrat [10 mM], pH 6) aufgekocht. Die so vorbereiteten Schnitte konnten anschließend in einer feuchten Färbekammer gefärbt werden. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurde zunächst

für 10 min mit Protein Block inkubiert. Die folgende Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper wurde für anti-LOX 1 h bei RT bzw. für anti-MAP4K4 über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde mit Aqua bidest, TBS (TrisBase [20 mM], NaCl [130 mM], pH 7.4) 0.025 % Tween und TBS gewaschen und mit einem Sekundärantikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, für 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Aqua bidest, TBS 0.025 % Tween und TBS wurden die Schnitte zur Visualisierung für 5 - 30 min mit Fast FastRed Naphthol gefärbt und die Reaktion mit Wasser wieder abgestoppt. Anschließend wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin (1 min) durchgeführt und die Schnitte nach ca. 5 min Bläuen in Leitungswasser mithilfe von Aquatex mit Deckgläschen eingedeckt. Die Auswertung aller Schnitt- und TMA-Färbungen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kilic vom Institut für Pathologie (Charité-Universitätsmedizin Berlin) vorgenommen.

Tissue-Mikroarray (TMA)

Zur Analyse einer größeren Anzahl von Patienten wurde die immunhistochemische Färbung an einem TMA durchgeführt. Der hier verwendete TMA wurde im Labor der urologischen Forschungsabteilung angefertigt und lag zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits vor. Jede Stanze umfasst einen Ausschnitt mit 1 mm Durchmesser eines zuvor genau verifizierten Bereiches des archivierten Gewebematerials, wobei von jedem verwendeten Gewebeblock (entspricht einem Tumor) jeweils 3 Stenzen Tumorgewebe auf dem TMA aufgebracht sind.

Von diesen TMA-Blöcken wurden mit einem Mikrotom 4 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, an welchen anschließend die immunhistochemische Färbung der jeweiligen spezifischen Proteine sowie eine Kernfärbung durchgeführt wurde.

2.2.4. Statistische Auswertverfahren

Für die statistischen Auswertungen wurden die Software-Programme SPSS (Version 23) und GraphPad Prism 5 verwendet. Es wurden sowohl parametrische (Student's t-Test, ANOVA) als auch nicht-parametrische Tests (Wilcoxon-Test, Mann-Whitney-Test; Spearman's Rang-Korrelationskoeffizient) für gepaarte und ungepaarte Daten eingesetzt. An den entsprechenden Stellen ist im Text darauf verwiesen. Um das diagnostische Potenzial von Parametern darzustellen, wurde eine Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse durchgeführt und der AUC (area under the curve)-Wert bestimmt. Überlebenskurven wurden mit Kaplan-Meier-Analysen unter Durchführung des Log Rank-Tests ermittelt. Univariate und multivariate Cox-Regressionen wurden zur Einschätzung der Variablen (klinisch-pathologische Faktoren, Expressionsdaten) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zeitdauer bis zum Eintreten des Ereignisses (hier: Tod) angewendet. Als signifikant wurden p-values < 0.05 gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Analytisch bedingte Verzerrungen von miRNA-Profilen

In unserem Labor wird Gesamt-RNA seit 2007 standardmäßig mit dem miRNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zur Bedeutung von epigenetisch dysregulierten miRNAs zeigten sich, eher zufällig durch den Einsatz einer anderen Isolierungstechnik, deutliche Differenzen in den ermittelten miRNA-Expressionen, insbesondere der miR-141. Dies war Anlass, diesem Problem durch systematische Untersuchungen zusätzlich zur eigentlichen Thematik des Projekts nachzugehen. Hierbei stellte sich diese methodisch orientierte Arbeit als äußerst wichtig und in enger Beziehung zu der Thematik des Projekts stehend heraus und wurde daher in die vorliegende Doktorarbeit mit aufgenommen. Die miR-141 schien dabei von der zu untersuchenden Problematik besonders betroffen zu sein und sollte daher in die Analyse mit eingeschlossen werden. Da das Expressionsniveau der miR-141 in RCC-Zellen jedoch sehr gering ist, wurden als Modell die zwei Harnblasenzelllinien RT4 und RT112 gewählt, die eine wesentlich höhere miR-141-Expression zeigen.

Um die Bedeutung der RNA-Isolierungsmethode für das miRNA-Expressionsprofiling zu untersuchen, wurde zunächst durch fünf unterschiedliche Isolierungstechniken (Ambion (A), Exiqon (E), Qiagen (Q), Trizol (T) und Zymoresearch (Z)) Gesamt-RNA aus den Blasenzelllinien RT4 und RT112 isoliert. Anschließend wurde der methodikabhängige Einfluss auf die RNA-Quantität und -Integrität, auf die Zusammensetzung der RNA im small-RNA-Bereich sowie auf das erstellte miRNA-Expressionsprofil analysiert.

Hierzu wurde zunächst die RNA-Konzentration bestimmt und die Ausbeute der Gesamt-RNA pro 10^6 Zellen errechnet. Es ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden, wobei die Menge der isolierten RNA um das bis zu 6-fache variierte (Abbildung 10). Die RNA-Integrität war jedoch über alle Methoden hinweg konstant gut und lag stets bei einem RIN-Wert von 9 (Daten nicht gezeigt).

Wichtig für das miRNA-Profilung ist vor allem die Isolierung von RNA im small-RNA-Bereich. Daher wurden die RNA-Proben mithilfe eines small-RNA-Chips in ihre small-RNA- (0 - 290 nt) und miRNA-Bereiche (10 - 40 nt) aufgeschlüsselt (Abbildung 10 rechts). Hierbei ergaben sich zwischen den Isolierungstechniken erhebliche Unterschiede in der RNA-Zusammensetzung im Hinblick auf die molekulare Größe. Der Anteil an small RNA variierte dabei zwischen ca. 8 % (Exiqon und Qiagen) und ca. 25 % (Ambion) der Gesamt-RNA (Abbildung 10). Auch der Anteil des miRNA-Bereichs unterschied sich stark und lag bei den meisten Methoden unter 10 %, bei Zymoresearch jedoch bei 20 - 30 % des small-RNA-Bereichs. Wie in Abbildung 10 ersichtlich ist, war der Effekt auf die Gesamtausbeute und die Zusammensetzung des small-RNA-Bereichs in beiden Zelllinien gleich, somit scheinen die Unterschiede tatsächlich durch die Art der Isolierungstechnik bedingt zu sein.

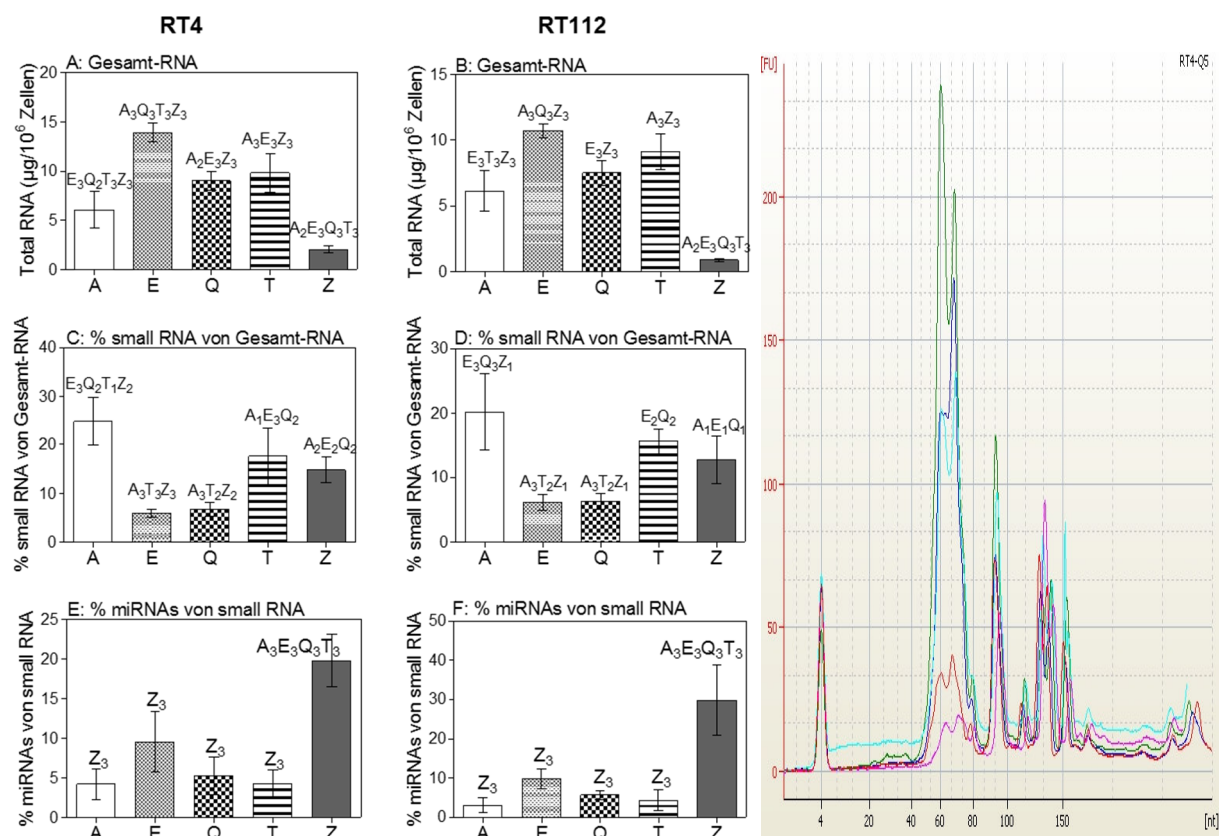


Abbildung 10. RNA-Isolierung aus Zelllinien in Abhängigkeit von der Isolierungstechnik.

Gesamt-RNA wurde aus den Blasenzelllinien RT4 und RT112 mit fünf unterschiedlichen Techniken isoliert, die auf der X-Achse gezeigt sind: Ambion (A), Exiqon (E), Qiagen (Q), Trizol (T), und Zymoresearch (Z). A und B geben die Ausbeute wieder. C bis F stellen den Anteil der small RNA an Gesamt-RNA bzw. der miRNA an small RNA dar. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD von fünf separaten Isolierungen. Die Symbole über den Balken verdeutlichen die statistischen Unterschiede zu den anderen Methoden, wobei die tiefgestellten Zahlen das Signifikanzniveau anzeigen. One-way ANOVA, korrigiert nach Holm-Sidak für multiple Vergleiche; 1 = $p < 0.05$; 2 = $p < 0.01$; 3 = $p < 0.001$.

Um den Einfluss der angewendeten Isolierungstechnik auf das zu erstellende miRNA-Profil zu analysieren, wurden die Harnblasen-relevanten miRNAs miR-100-5p, -130a-3p, -141-3p, -148b-3p, -151-3p und -205-5p mittels RT-qPCR bestimmt. Auch hierbei ergaben sich bei allen miRNAs erhebliche Unterschiede zwischen den Isolierungsmethoden. Beispielhaft sind hier die Ergebnisse für die miR-141 und miR-205 dargestellt (Abbildung 11, Anhang 3). Exiqon zeigte dabei die niedrigsten Expressionen beider miRNAs, die um das bis zu 32-fache geringer waren als bei den übrigen Methoden. Während Trizol und Zymoresearch ähnliche Ergebnisse zeigten, variierten die Ergebnisse mit den anderen Methoden alle signifikant. Diese Unterschiede waren wieder in beiden Zelllinien zu beobachten, somit scheint auch der Effekt auf die spezifische miRNA-Expression durch den Isolierungsprozess bedingt zu sein. Durch die Normalisierung auf die häufig eingesetzten Referenzgene RNU6B oder RNU48 wurde der Isolierungseffekt zum Teil sogar nochmals verstärkt.

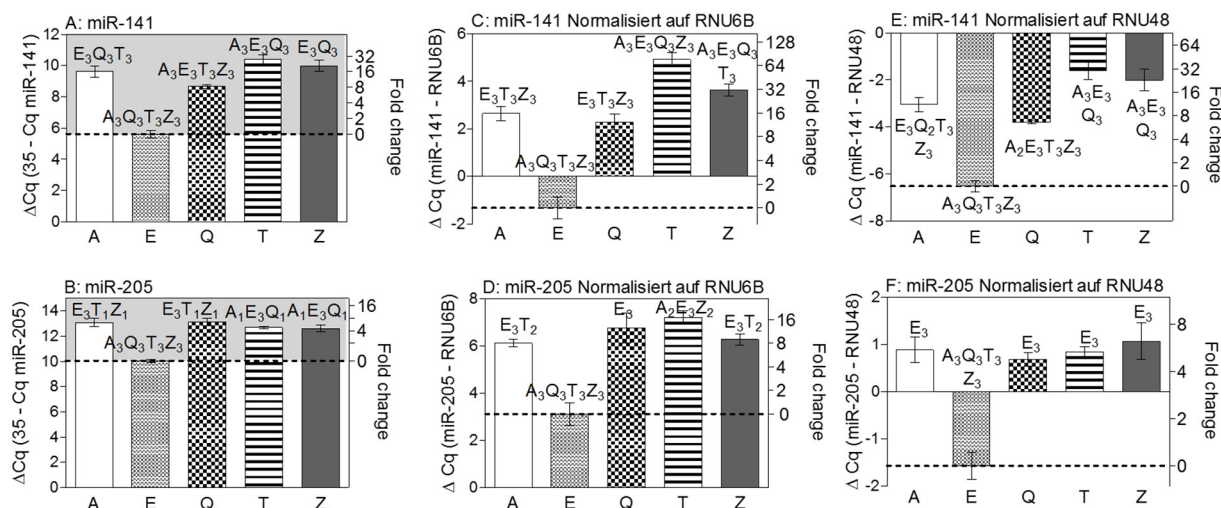


Abbildung 11. Expression von microRNAs in RT4-Zellen in Abhängigkeit von der Isolierungstechnik.

Gesamt-RNA wurde aus Blasenzelllinien mit fünf unterschiedlichen Techniken isoliert, die auf der X-Achse gezeigt sind: Ambion (A), Exiqon (E), Qiagen (Q), Trizol (T) und Zymoresearch (Z). Die Expression von miRNAs und RNUs wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD, wobei in A und B nicht, in C und D auf RNU6B und in E und F auf RNU48 normalisiert wurde. Die Symbole über den Balken verdeutlichen die statistischen Unterschiede zu den anderen Methoden. Tiefgestellte Zahlen zeigen das Signifikanzniveau an. One-way ANOVA, korrigiert nach Holm-Sidak für multiple Vergleiche; 1 = $p < 0.05$; 2 = $p < 0.01$; 3 = $p < 0.001$.

Um den beobachteten Einfluss der Isolierungstechnik auf das miRNA-Expressionsprofil zu validieren, wurde Gesamt-RNA aus Tumorgewebe der Blase, Niere und Prostata isoliert. Hierbei wurden die beiden Techniken Qiagen und Exiqon verglichen. Qiagen wurde ausgewählt, da dies die Standardmethode in unserem Labor darstellt und Exiqon, da diese Methode in den bisherigen Versuchen die größten Abweichungen gezeigt hatte. Im Gegensatz zu der Isolierung von RNA aus Zelllinien unterschied sich die RNA-Ausbeute beim Gewebe jedoch kaum. Lediglich die isolierte RNA-Menge aus Blasengewebe war bei Exiqon etwas geringer als bei Qiagen (Abbildung 12). Die Integrität der mit beiden Isolierungstechniken gewonnenen RNA unterschied sich ebenfalls nicht. Im Vergleich zu der Gesamt-RNA aus Zelllinien zeigte die aus Gewebe isolierte RNA jeweils einen proportional größeren small-RNA-Anteil, wobei sich die small-RNA- und miRNA-Fraktion signifikant zwischen den beiden Methoden unterschieden. Qiagen wies dabei jeweils einen größeren Anteil an small RNA und auch an miRNA auf (Abbildung 12).

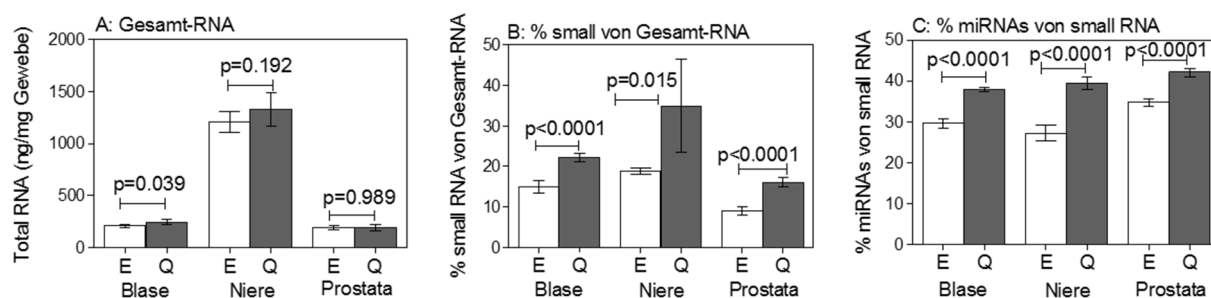


Abbildung 12. RNA-Isolierung aus Karzinomgewebe von Harnblase, Niere und Prostata in Abhängigkeit von der Isolierungstechnik.

Gesamt-RNA wurde aus Karzinomgewebe der Harnblase, Niere und Prostata mit den Techniken von Exiqon (E) und Qiagen (Q) isoliert. A: stellt die Ausbeute, B und C den Anteil der small RNA an Gesamt-RNA bzw. miRNA an small RNA dar. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD von fünf separaten Isolierungen. t-Test.

Zur Analyse des Isolierungsbedingten Effekts auf das miRNA-Profil wurden wieder Gewebe-relevante miRNAs (miR-100-5p, -141-3p, -148b-3p und -205-5p) gemessen. Wie hier am Beispiel der miR-141 und miR-205 gezeigt ist, ergab die mit der Exiqon-Isolierungstechnik gewonnene RNA aller drei Gewebe eine geringere Expression der untersuchten miRNAs um etwa 2 - 4 Zyklen (entspricht einem 6- bis 12-fachen Unterschied), wobei der Umfang dieser Differenz zwischen den Geweben zum Teil signifikant variierte (Abbildung 13). Der Effekt auf die Expression variierte dabei erheblich zwischen den einzelnen miRNAs, wobei er den RNUs insgesamt mit etwa 0.5 - 1.5 Zyklen (entspricht einem 1.5- bis 4.5-fachen Unterschied) etwas geringer ausfiel. Durch Normalisierung auf diese RNUs wurde die Verzerrung des miRNA-Expressionsprofils aber nochmals verstärkt (Abbildung 13).

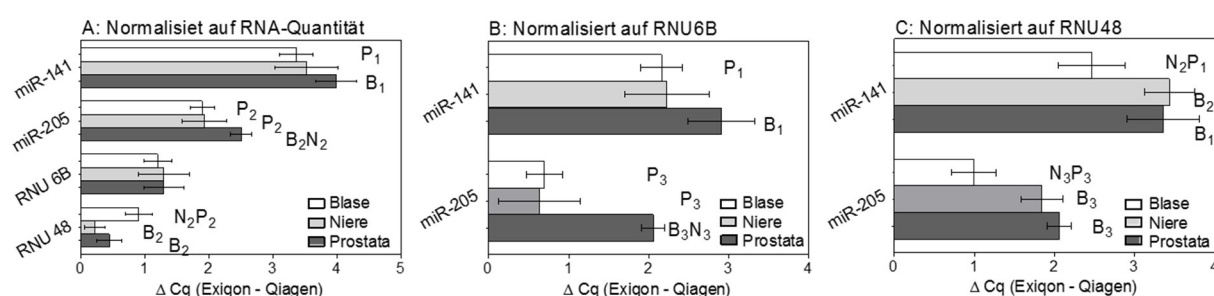


Abbildung 13. Expression von microRNAs in Karzinomgewebe in Abhängigkeit von der Isolierungstechnik und Normalisierung.

Gesamt-RNA wurde aus Karzinomgewebe der Harnblase (B), Niere (N) und Prostata (P) mit den Methoden von Exiqon (E) und Qiagen (Q) isoliert. Die Expressionen von miRNAs (miR-141 und miR-205) und RNUs (RNU6B und RNU48) wurden mittels RT-qPCR gemessen. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD der Differenz zwischen Exiqon und Qiagen, wobei in A auf die RNA-Quantität, in B auf RNU6B und in C auf RNU48 normalisiert wurde. Die Symbole neben den Balken verdeutlichen die statistischen Unterschiede zu den anderen Gewebetypen, wobei die tiefgestellten Zahlen das Signifikanzniveau anzeigen. One-way ANOVA, korrigiert nach Holm-Sidak für multiple Vergleiche; 1 = $p < 0.05$; 2 = $p < 0.01$; 3 = $p < 0.001$.

Wie hier deutlich gezeigt werden konnte, hat die Wahl der Isolierungstechnik einen enormen Einfluss auf die RNA-Ausbeute und die RNA-Zusammensetzung der gewonnenen RNA-Probe, aber auch auf das daraus erstellte miRNA-Expressionsprofil. Um mögliche Verzerrungen der Ergebnisse auszuschließen, wurden alle für die weiteren Untersuchungen nötigen RNA-Isolierungen ausschließlich mit der Methode nach Qiagen durchgeführt.

3.2. Epigenetische Regulation von microRNAs in RCC-Zelllinien

Zum Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass sich das miRNA-Profil des ccRCC wie auch das Muster anderer Karzinome, durch eine hohe Anzahl herunterregulierter miRNAs auszeichnet (Schaefer et al. 2010b). Mögliche Ursachen hierfür wurden bereits diskutiert, bis dahin aber speziell für das Nierenzellkarzinom noch nicht untersucht. Während der erste Teil der Arbeit methodisch orientiert war und eine verlässliche Grundlage für die weiteren Experimente bilden sollte, sollte in den folgenden Teilen dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit eine methylierungsvermittelte Inaktivierung an der Dysregulation dieser miRNAs beteiligt ist. Hierfür wurden zunächst im ccRCC-Profil herunterregulierte miRNAs ausgewählt und durch experimentelle *in-vitro*-Demethylierung eine epigenetische Beteiligung an der Expressionsregulation überprüft. Anschließend sollte der Methylierungsstatus der epigenetisch regulierten miRNAs auf molekularer Ebene genauer betrachtet werden.

3.2.1. Selektion von herunterregulierten microRNAs

Als Ausgangspunkt für diese Arbeit wurden die Ergebnisse eines miRNA-Microarrays (AMADID 016436; Agilent) verwendet, der in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Berlin, Deutschland) durchgeführt wurde und zu Beginn dieser Arbeit bereits vorlag. Die Daten des Microarrays sind in der NCBI Gene Expression Omnibus Datenbank unter der GEO Accession No. GSE12105 öffentlich zugänglich. Die Analyse, Validierung und Publikation der Daten erfolgte primär durch Kollegen der Klinik für Urologie (Charité-Universitätsmedizin Berlin) unter dem Aspekt, differenziell exprimierte miRNAs als diagnostische und prognostische Indikatoren zu nutzen (Jung et al. 2009). Die von Frau Wotschofsky und mir zusammen vorgenommene zusätzliche Auswertung der Microarray-Daten wurde mit dem Fokus auf ein metastasenspezifisches Expressionsprofil der miRNAs durchgeführt. Dabei wurde für 30 miRNAs eine Dysregulation zwischen den drei Gruppen Normal-, ccRCC- und Metastasengewebe durch RT-qPCR nachgewiesen (Wotschofsky, Liep et al. 2012). Hier zeigte sich ebenfalls vorwiegend eine verringerte Expression, wobei die meisten miRNAs eine stufenweise Verringerung der Expression von Normal- über primäres, nicht-metastasiertes ccRCC- zum Metastasengewebe aufwiesen.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Auswertung erfolgte die Auswahl der für die Fragestellung dieser Arbeit interessierenden herunterregulierten miRNAs (Tabelle 8). Da man von einer Zunahme der epigenetischen Hemmung im Verlauf der Tumorprogression ausgeht, wurden zunächst die miRNAs in die Analyse eingeschlossen, welche eine stufenweise Herunterregulation im Profiling gezeigt hatten. Ausgeschlossen wurden miR-19a, miR-29c und miR-143, da diese jeweils ein Cluster mit miR-19b, miR-29b oder miR-145 bilden und somit ähnliche Effekte wie bei diesen zu erwarten sind. Somit wurden die in der Tabelle 8 aufgeführten 17 miRNAs in die Analyse einbezogen.

Tabelle 8. Liste der für die Analyse ausgewählten microRNAs.

microRNA	ccRCC vs. NN ^a	M vs. ccRCC ^a
	fold change	fold change
miR-100-5p	-1.82	-1.87
miR-101-3p	-1.28	-3.56
miR-10b-5p	-1.89	-3.44
miR-127-3p	-1.86	-1.43
miR-130a-3p	-1.14	-1.78
miR-141-3p	-61.33	-3.91
miR-145-5p	-1.05	-2.56
miR-148a-3p	-1.54	-1.65
miR-192-5p	-2.34	-5.13
miR-194-5p	-2.43	-7.04
miR-19b-3p	-1.10	-1.71
miR-200c-3p	-7.55	-2.62
miR-215-5p	-1.74	-7.31
miR-26a-5p	-1.61	-2.11
miR-29a-3p	-1.47	-1.98
miR-29b-3p	-1.14	-4.28
miR-514	-37.31	-3.78

ccRCC = Gewebe von primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen

NN = Gewebe von normaler Niere

M = Gewebe von Knochenmetastasen von klarzelligen Nierenzellkarzinomen

^a fold change berechnet nach RT-qPCR-Daten von Wotschovsky, Liep et al. 2012

3.2.2. Re-expression von microRNAs durch Hemmung epigenetischer Mechanismen

Um zu testen, ob epigenetische Mechanismen eine Rolle bei der Herunterregulation von miRNAs im Nierenzellkarzinom spielen, wurde eine experimentelle *in-vitro*-Demethylierung von Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurden unterschiedliche Nierentumorzelllinien mit dem demethylierend wirkenden Cytidin-Derivat 5-Aza 2'-deoxycytidin (Aza) und dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) inkubiert. Diese Behandlung bewirkt eine Aufhebung der beiden inhibierenden epigenetischen Modifikationen DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung und soll somit zur Re-expression der durch epigenetische Modifikationen stillgelegten Gene führen. Verwendet wurden die beiden Zelllinien 786-O und A498 aus primären Tumoren sowie die Metastasenzelllinien Caki-1 und ACHN.

Da bekannt ist, dass beide verwendeten Substanzen zelltyp- und konzentrationsabhängige Zytotoxizität zeigen, wurde zunächst in Vorversuchen das optimale Behandlungsschema ermittelt. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und der Einfluss auf die Zellproliferation ermittelt. Dabei konnte eine Hemmung der Proliferation bei steigender Konzentration beobachtet werden, welche bei den einzelnen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt war. Da bei der *in-vitro*-Demethylierung eine möglichst effektive Wirkung erzielt werden sollte, sollte eine möglichst hohe Konzentration der Substanzen eingesetzt werden. Diese sollte jedoch eine möglichst geringe Toxizität auf die Zellen haben. Daher wurden die Konzentrationen von 1 μ M Aza bzw. 100 nM TSA gewählt (Abbildung 14). Analog zu anderen Arbeiten (Sato et al. 2003) wurde daher als Behandlungsschema eine Inkubation von 72 h mit 1 μ M Aza oder 72 h mit 1 μ M Aza und anschließend 24 h mit 100 nM TSA für die Behandlung der Zellen verwendet. Da Aza in die DNA eingelagert und so allmählich verbraucht wird, wurde diese Substanz durch Mediumwechsel alle 24 h erneuert.

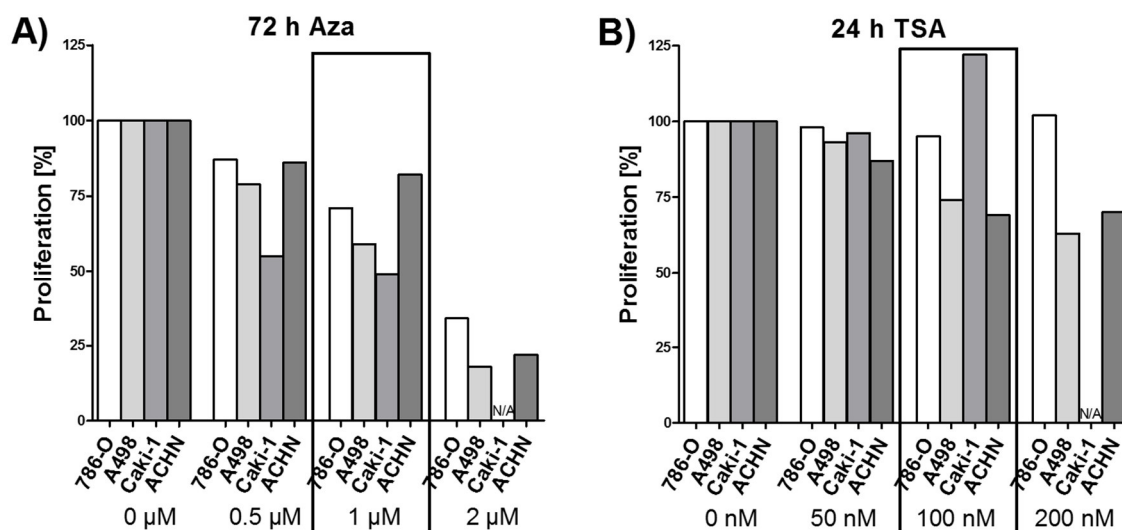


Abbildung 14. Konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation durch epigenetische Inhibitoren.

Austesten der Wirkung von unterschiedlichen Konzentrationen von A) Aza und B) TSA auf die Proliferation der Nierenkarzinomzelllinien mittels XTT-Test. Konzentrationen von 1 μ M Aza bzw. 100 nM TSA wurden für die folgenden Behandlungen verwendet.

Die Zelllinien 786-O, A498, Caki-1 und ACHN wurden nach dem ermittelten Schema behandelt, die Gesamt-RNA isoliert und die Expression der zu untersuchenden miRNAs vor und nach Demethylierung ermittelt. Im Laufe dieser Untersuchungen wurde eine Authentifizierung der Zelllinien durchgeführt um eine mögliche Kontamination mit anderen Zellen auszuschließen. Hierbei stellte sich heraus, dass es sich bei der verwendeten Caki-1 Zelllinie um eine Mischkultur aus Caki-1 und BC3-Zellen handelte. Die Versuche wurden im Anschluss an verifizierten Caki-1 Zellen wiederholt, wobei jedoch nur die miRNAs untersucht wurden, die bereits in einer anderen Zelllinie eine Re-expression durch Demethylierung gezeigt hatten.

In Tabelle 9 ist aufgeführt, bei welchen miRNAs eine Re-expression durch die Behandlung in den einzelnen Zelllinien erzielt werden konnte. Bei miR-127, miR-141, miR-145 und miR-514 zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression unter dem Einfluss der beiden Substanzen bei mindestens zwei der getesteten Zelllinien (Abbildung 15). Dabei hatte in den meisten Fällen die Behandlung mit Aza allein schon eine signifikante Steigerung der Expression zur Folge. Durch die Kombination von Aza + TSA ergab sich jedoch ein synergistischer Effekt der beiden Substanzen, der grundsätzlich eine stärkere Re-expression bewirkte als die Einzelbehandlung mit Aza. Die miR-194 zeigte ebenfalls eine Re-expression nach Demethylierung, allerdings nur in einer der analysierten Zelllinien. Für die übrigen miRNAs konnte keine Re-expression ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 9. Re-expression von microRNAs durch Hemmung epigenetischer Mechanismen in Zelllinien.

microRNA	Re-expression nach Demethylierung			
	786-O	A498	Caki-1	ACHN
miR-100-5p	-	-	N/A	-
miR-101-3p	-	-	N/A	-
miR-10b-5p	-	-	N/A	-
miR-127-3p	+	+	+	-
miR-130a-3p	-	-	N/A	-
miR-141-3p	+	-	+	+
miR-145-5p	+	-	+	+
miR-148a-3p	+	-	N/A	-
miR-192-5p	-	-	N/A	-
miR-194-5p	+	-	-	-
miR-19b-3p	-	-	N/A	-
miR-200c-3p	-	-	N/A	-
miR-215-5p	-	-	N/A	-
miR-26a-5p	-	-	N/A	-
miR-29a-3p	-	-	N/A	-
miR-29b-3p	-	-	N/A	-
miR-514	-	+	-	+

+ = signifikante Re-expression nach Aza und/oder Aza + TSA

- = keine Re-expression nach Aza und/oder Aza + TSA

N/A = nicht bestimmt

Die vier verwendeten Zelllinien wiesen in unbehandeltem Zustand vorwiegend ein sehr niedriges Expressionsniveau der hier re-exprimierten miR-127, miR-141, miR-145 und miR-514 im Vergleich zu normalem Nierengewebe auf (Abbildung 16). Die Expression von miR-127 war deutlich erhöht in den drei behandelten Zelllinien 786-O, A498 und Caki-1, die nativ nur eine geringe Expression dieser miRNA zeigten. In ACHN-Zellen, bei denen die Expression von miR-127 in unbehandeltem Zustand bereits höher lag, war dieser Effekt nach der Behandlung mit Aza und TSA kaum vorhanden. Dies war auch für miR-145 zu beobachten. Hier zeigten ebenfalls die drei Zelllinien mit sehr geringer miR-145 Grundexpression (in diesem Fall 786-O, Caki-1 und ACHN) eine starke Steigerung der Expression nach der Behandlung, wohingegen bei A498 Zellen, die eine etwas höhere Expression von miR-145 vorwiesen, keine Veränderung messbar war. Die miR-141 war in allen vier Zelllinien kaum exprimiert und zeigte in allen untersuchten Zelllinien eine Zunahme der Expression nach Aza- und TSA-Behandlung der Zellen.

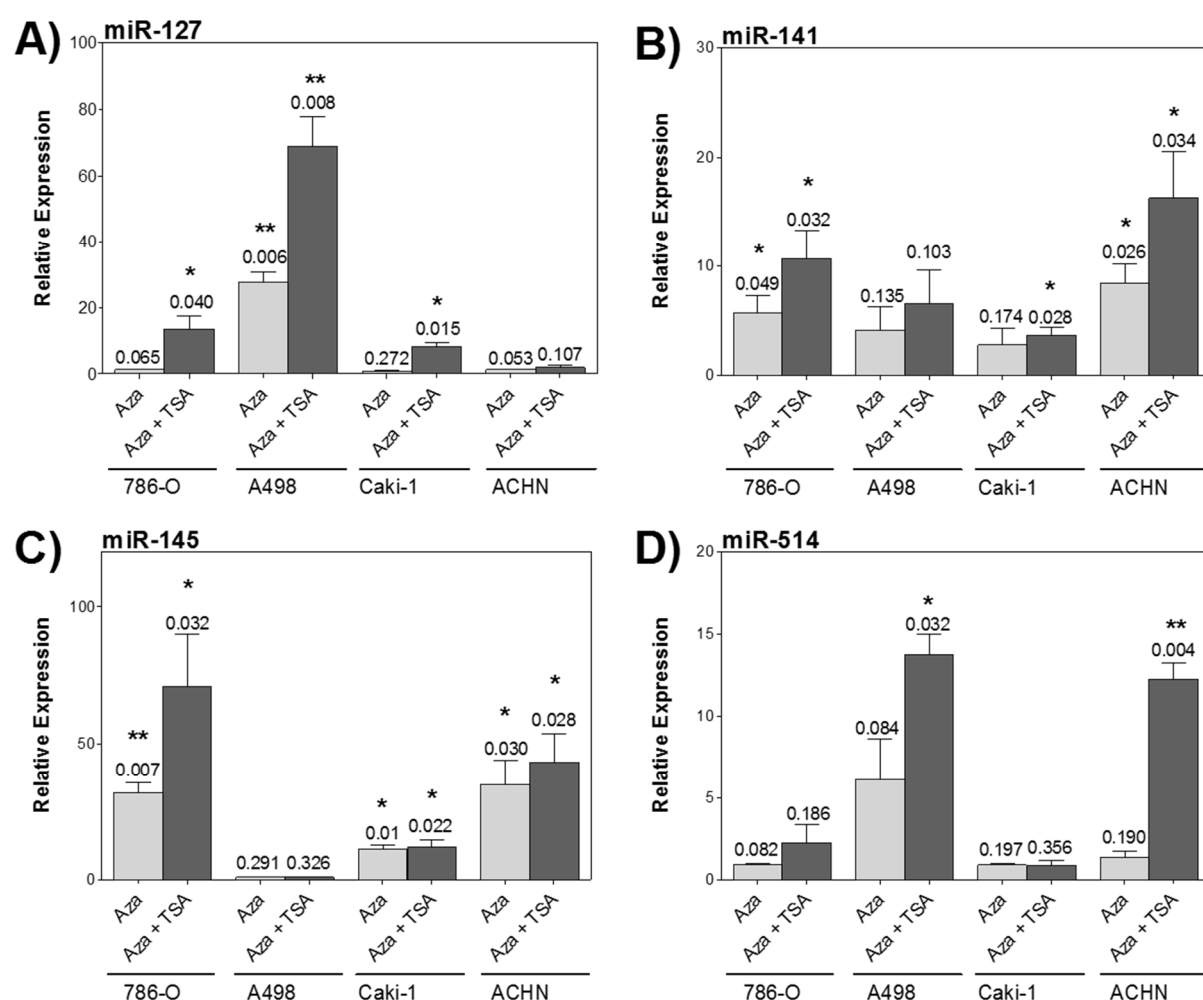


Abbildung 15. Re-expression von microRNAs durch Hemmung epigenetischer Mechanismen in Zelllinien.

Expression von A) miR-127, B) miR-141, C) miR-145 und D) miR-514 in den Nierentumorzelllinien 786-O, A498, Caki-1 und ACHN nach Behandlung mit Aza oder Aza + TSA. Die Daten sind angegeben in relativer Expression (Mittelwert \pm SEM) zur Expression der jeweiligen unbehandelten Zellen, die gleich eins gesetzt wurde. Normalisiert wurde auf die Referenzgene RNU6B und RNU48. P-values sind angegeben und auf die jeweiligen unbehandelten Zellen bezogen. n = 3; t-test (one-tailed); *p < 0.05; **p < 0.01 (entnommen und adaptiert aus Wotschovsky, Liep et al. 2012).

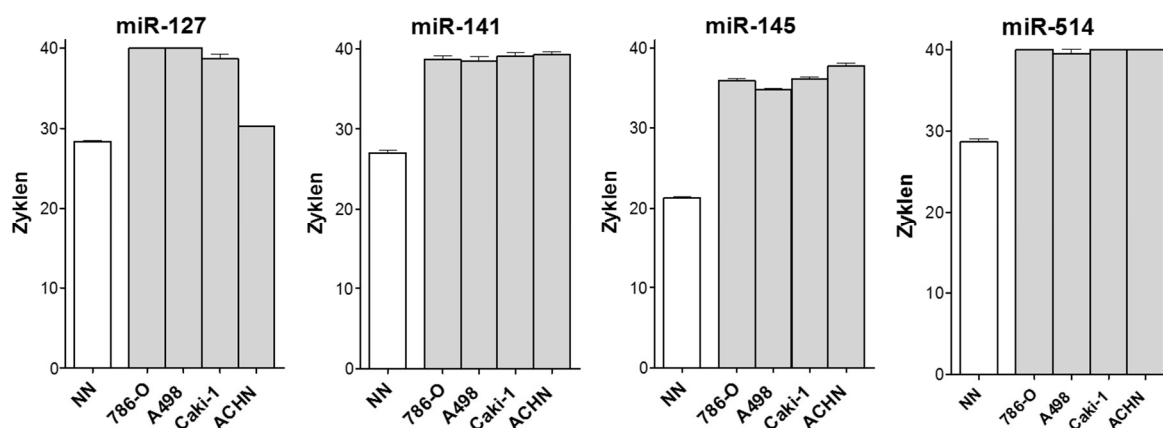


Abbildung 16. Expressionsniveau der epigenetisch herunterregulierten microRNAs.

Expressionsniveau der herunterregulierten miRNAs im normalen Nierengewebe von 22 RCC-Patienten und Nierentumorzelllinien ($n = 3$). Die Expression in den verwendeten Zelllinien war sehr gering und lag z. T. unterhalb der zuverlässigen Detektionsgrenze. Angegeben sind die Zyklenzahlen der RT-qPCR (Mittelwert \pm SEM). Patientendaten siehe Wotschovsky, Liep et al. 2012; NN = Nierennormalgewebe von RCC-Patienten.

Durch neueste Deep-Sequencing-Technologien können Sequenzen immer genauer analysiert werden. Daher werden auch Daten zu miRNAs immer exakter und zuverlässiger. Im Laufe dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die bis *dato* als human beschriebene und hier verwendete Sequenz der miR-514 nicht der exakten humanen Basenfolge entspricht. Die aktuelle Sequenz, die nun für hsa-miR-514b angegeben wird, unterscheidet sich in ihren letzten drei Basen von der ursprünglichen miR-514. Die Versuche wurden mit dem entsprechenden Assay für die aktuelle humane Sequenz wiederholt (Daten nicht gezeigt). Da die Ergebnisse jedoch nicht mit den vorherigen übereinstimmten, wurde die miR-514 aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

3.2.3. Methylierungsstatus

In den oben durchgeführten Demethylierungsversuchen wurde nachgewiesen, dass die Blockierung der DNA-Methylierung allein schon die Re-expression von miR-127, miR-141 und miR-145 auslösen kann. Daher sollte nun der Methylierungsstatus auch auf molekularer Ebene genauer untersucht werden, um zu überprüfen, ob die zuvor beschriebenen Ergebnisse auf die Demethylierung der entsprechenden Promotorregionen zurückgeführt werden können. Hierfür wurde eine Bisulfitequenzierung an unbehandelten und demethylierten Zellen durchgeführt.

Um CpG-Inseln auffindig zu machen, wurden zunächst die Promotorregionen mithilfe des Online-Programms MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) genauer betrachtet (Li et al. 2002). Hierbei wurden die Parameter auf Window: 100; Shift: 1; Obs/Exp: 0,6; GC %: 50 % festgelegt. Untersucht wurde die Sequenz von 500 bp bzw. 800 bp downstream bis 500 bp upstream des jeweiligen Transkriptionsstarts der miR-127, miR-141 und miR-145. Im untersuchten Bereich weist die miR-127 zwei CpG-Inseln auf (Abbildung 17A). Die erste befindet sich 150 bp vor dem Transkriptionsstart. Die zweite beginnt etwa in der Mitte der

codierenden Region und erstreckt sich über eine längere Sequenz. Die bei miR-141 gefundene CpG-Insel liegt etwa 550 bp vor dem Transkriptionsstart (Abbildung 17B). Im Bereich des Transkriptionsstarts sind jedoch auch vereinzelte CpG-Stellen zu finden, welche nicht zu einem Cluster angeordnet sind. In der untersuchten Sequenz der miR-145 konnte das Programm mit den verwendeten Parametern keine CpG-Insel identifizieren (Abbildung 17C). Es liegen aber zahlreiche CpG-Stellen vor, die potenziell methyliert sein können.

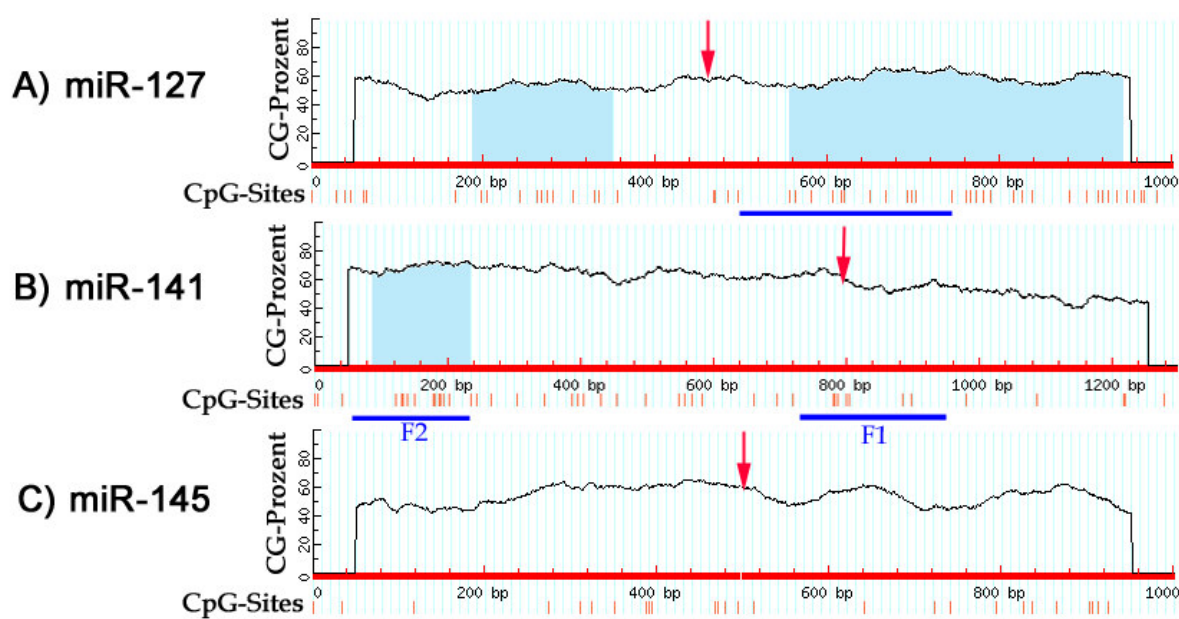


Abbildung 17. CpG-Insel Vorhersage für Promotorregionen von miR-127, miR-141 und miR-145.

Vorhersage von CpG-Inseln für die Promotorregionen der miR-127, miR-141 und miR-145 mithilfe von MethPrimer. Dargestellt ist der Bereich von 500 bp bzw. 800 bp vor bis 500 bp nach Transkriptionsstart. Rote Pfeile markieren den jeweiligen Transkriptionsstart. Die durch das Programm vorhergesagten CpG-Inseln werden durch hellblaue Füllung des Sequenzbereichs dargestellt. Rote Markierungen unterhalb der Sequenz zeigen einzelne CpG-Stellen an. Die blauen Balken unterhalb der Sequenz zeigen die durch Bisulfitequenzierung untersuchten Bereiche an.

Für die Bisulfitequenzierung wurde die Zelllinie 786-O verwendet, da die *in-vitro*-Demethylierung dieser Zellen für alle drei ausgewählten miRNAs einen starken Effekt gezeigt hatte (Abbildung 15). Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, weisen die untersuchten Bereiche aller drei miRNAs im unbehandelten Zustand eine starke Methylierungsrate auf. Im Promotorbereich von miR-141 lagen fast 100 % der CpG-Stellen methyliert vor. Durch die Behandlung mit Aza + TSA kam es hier sowohl bei Fragment F1, das direkt im codierenden Bereich liegt, als auch bei dem entfernteren downstream gelegenen Fragment F2 zu einer signifikanten Verringerung der Methylierung um bis zu über 50 %. Hierbei war der Effekt im fernen Fragment F2, welches innerhalb einer CpG-Insel liegt, stärker als bei Fragment F1 ohne CpG-Insel. Auch bei miR-127 kam es durch die Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Methylierung. Für miR-145 war es trotz großer Bemühungen in mehrfachen Versuchen nicht möglich, das entsprechende Fragment aus behandelten Zelllinien zu amplifizieren, so dass leider keine Daten für die Situation nach Demethylierung vorliegen. In unbehandeltem Zustand zeigt dieser Nicht-CpG-Insel-Bereich jedoch auch eine sehr starke

Methylierung von etwa 80 %. Nach den Daten in Abbildung 15 ist anzunehmen, dass es aber auch hier zu einer Reduktion der Methylierung gekommen ist.

Durch die *in-vitro*-Demethylierung mit Aza konnte also eine direkte Reduktion des Promotor-Methylierungsstatus der miRNAs erzielt werden (zumindest für zwei der drei untersuchten miRNAs nachgewiesen), die als Ursache für die Re-expression der herunterregulierten miRNAs anzusehen ist.

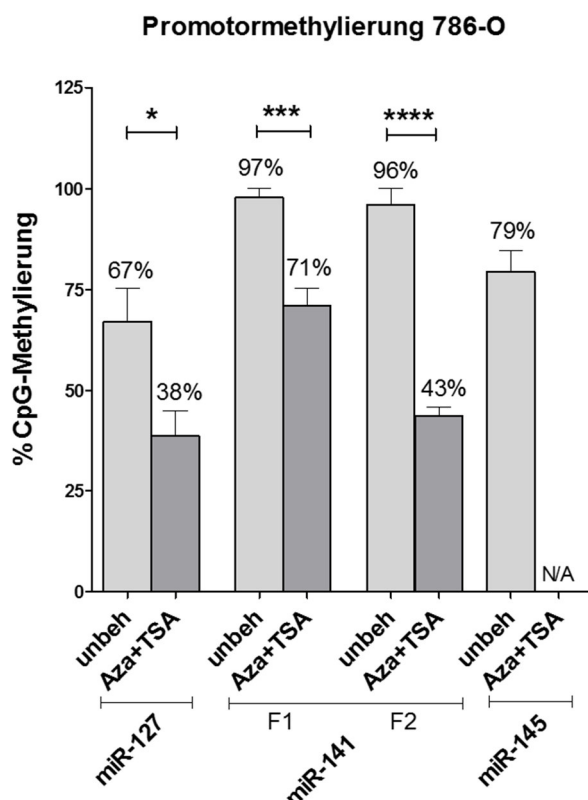


Abbildung 18. Methylierungsstatus der Promotorbereiche von miR-127, miR-141 und miR-145.

Bisulfitequenzierung der Promotorregion von miR-127, miR-141 und miR-145 in 786-O-Zellen vor und nach Inkubation mit Aza und TSA. Die isolierte genomische DNA von unbehandelten und behandelten Zellen wurde mit Bisulfit behandelt, die entsprechenden Promotorbereiche amplifiziert, in Vektoren kloniert und jeweils mindestens 7 Klone sequenziert. Für die miR-141 wurden zwei Fragmente F1 und F2 untersucht. Angegeben ist, wie viel Prozent (Mittelwert \pm SEM) der in dem jeweiligen Fragment vorkommenden CpG-Stellen methyliert vorlagen. N/A = nicht verfügbar; t-test (one-tailed); * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass epigenetische Veränderungen bei der Regulation der im Nierenzellkarzinom stark reduziert exprimierten miR-127, miR-141 und miR-145 eine entscheidende Rolle spielen. Zudem wurde nachgewiesen, dass diese epigenetischen Modifikationen in Tumorzelllinien wieder aufgehoben und die Expressionen der inhibierten miRNAs wieder hergestellt werden konnten.

In den weiteren Untersuchungen habe ich mich auf die mögliche funktionelle Bedeutung der miR-141 und miR-145 konzentriert. Die differenzielle Expression dieser beiden miRNAs wurde bisher hinsichtlich ihrer regulatorischen Bedeutung nicht nur im Zusammenhang mit dem Nierenzellkarzinom, sondern bereits auch mit anderen Tumoren diskutiert wurde. Es ist daher anzunehmen, dass beide miRNAs eine allgemeine Rolle in der Karzinogenese zukommt.

3.3. Funktionelle Bedeutung epigenetisch regulierter microRNAs in RCC-Zelllinien

Im folgenden Teil der Arbeit wurde nun untersucht, welchen Einfluss die in RCC-Zellen epigenetisch gehemmten miR-141 und miR-145 auf die proliferativen, migratorischen und invasiven Eigenschaften von Nierentumorzellen haben.

3.3.1. Überexpression von miR-141 und miR-145 in RCC-Zelllinien

Die Expression von miR-141 und miR-145 war, wie oben beschrieben, in den hier verwendeten Zelllinien nur sehr gering (Abbildung 16). Um die mögliche funktionelle Bedeutung der beiden miRNAs erfassen zu können, wurde ein Versuchsansatz gewählt, in dem die miRNAs in den Zelllinien 786-O und ACHN überexprimiert wurden.

Zur Simulation der Überexpression von miRNAs in Zellkulturen erfolgte eine Transfektion mit synthetischen pre-miRNAs. Zur Optimierung der Transfektion wurde eine Fluoreszenz-markierte Kontroll-miRNA (FAM-labeled pre-miR) verwendet und so die zytoplasmatische Lokalisation der miRNA nach Transfektion nachgewiesen (Abbildung 19A). Zur Kontrolle der funktionellen Aktivität der synthetischen miRNAs wurde ein aus der Literatur bekanntes spezifisches Target der miR-141 genutzt. Es wurde bereits gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-141 eine Hemmung von ZEB2 und eine gesteigerte Expression des Downstream-Targets E-Cadherin (CDH1) zur Folge hat (Nakada et al. 2008). Diese Beobachtung konnte mit unseren Transfektionsbedingungen ebenfalls nachgewiesen werden, wobei es in beiden Zelllinien durch Transfektion mit miR-141 zu einer Reduktion der ZEB2-Expression und einer Erhöhung der CDH1-Expression kam (Abbildung 19B-C). Es wurde somit belegt werden, dass die Transfektion eine Aufnahme der miRNAs erzielte und diese im Zellinneren aktiv ihre physiologische Funktion ausüben konnten.

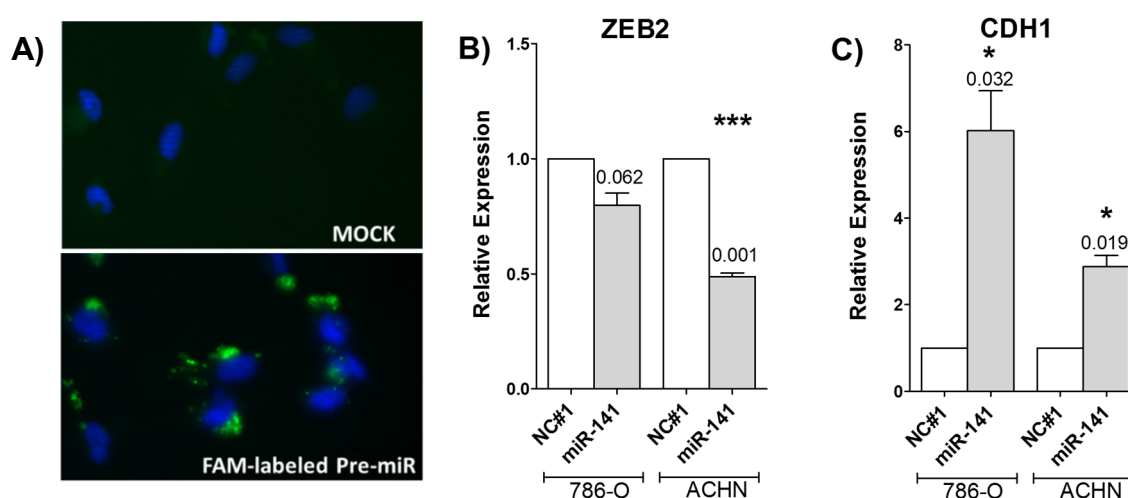


Abbildung 19. Etablierung der Transfektion mit synthetischen microRNAs.

A) zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation der FAM-markierter pre-miR (grün) in 786-O-Zellen. Zellkerne sind blau dargestellt durch DAPI-Färbung. B) Effekt der Transfektion mit miR-141 auf das Target ZEB2 und C) dessen Downstream Target CDH1. Angegeben sind p-values zur jeweiligen Kontrolle (Mittelwert \pm SEM). MOCK = Lipofectamine@2000; NC#1 = Negativkontrolle; n = 3; t-test (two-tailed); *p < 0.05; ***p < 0.001.

3.3.2. Funktionelle Untersuchungen der miR-141 und miR-145 in RCC-Zelllinien

Zu den wichtigsten deregulierten funktionellen Prozessen, deren Fehlregulation in Verbindung zur Tumorentstehung und Progression stehen, gehören die Zellproliferation, Zellmigration und Invasion. Daher sollte hier der Effekt der miR-141 und miR-145 auf diese zellulären Mechanismen in Nierentumorzellen untersucht werden.

Zellproliferation

Tumorzellen zeichnen sich durch eine erhöhte Proliferationsrate aus. Dies ist u. a. durch den Verlust der Kontaktinhibition und der Zellzykluskontrolle bedingt und ist eine grundlegende Voraussetzung für die Entstehung und das Wachstum des Tumors. Wie anhand eines Proliferationsassays gezeigt werden konnte, hatte die Überexpression der miR-141 einen schwach inhibierenden Einfluss auf die Zellproliferation von 786-O und ACHN-Zellen (Abbildung 20). Der Effekt war jedoch nur sehr gering und in unseren Untersuchungen nicht signifikant. Die Überexpression von miR-145 hatte hingegen keine Änderung der proliferativen Eigenschaften der Zellen zur Folge (Abbildung 20).

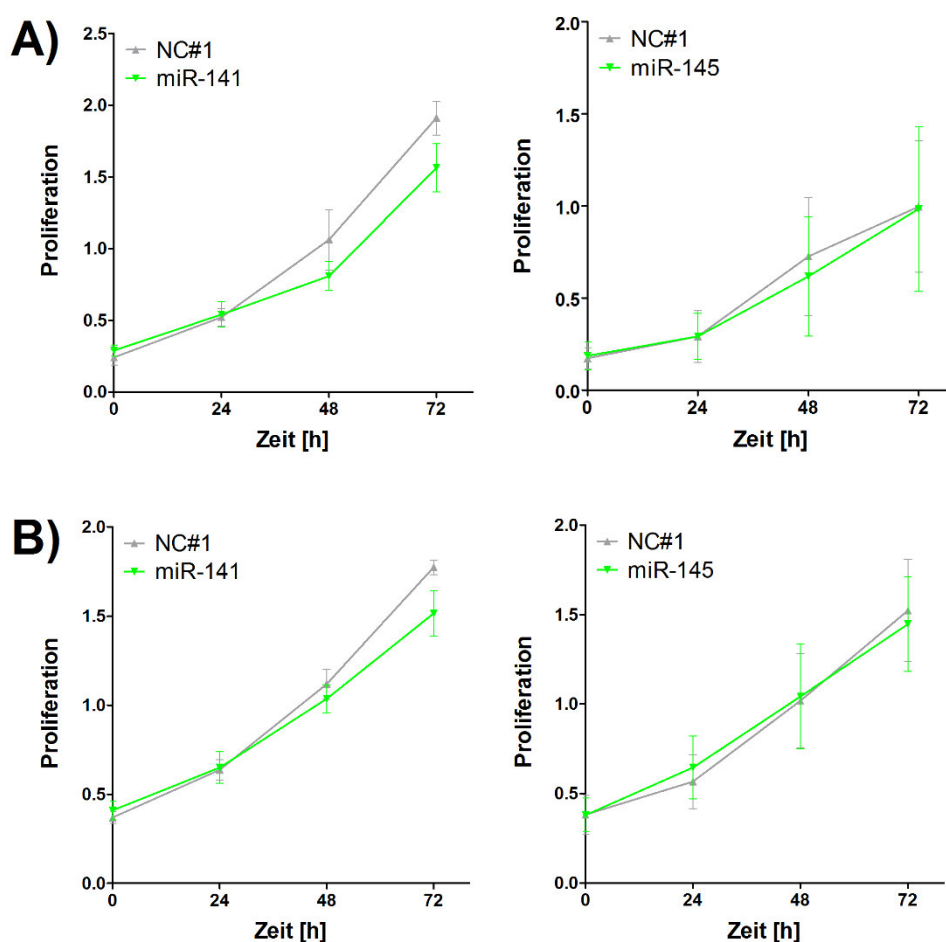


Abbildung 20. Effekt von miR-141 und miR-145 auf die Proliferation von 786-O und ACHN-Zellen.

Proliferation von A) 786-O und B) ACHN-Zellen. Die miR-141 weist eine Tendenz zur Hemmung der Proliferation von beiden Zelllinien auf. Die miR-145 zeigt dagegen keine Wirkung auf die Zellproliferation. Dargestellt ist die Proliferationsrate (Mittelwert \pm SEM). NC#1 = Negativkontrolle; n = 3.

Zellmigration und Zellinvasion

Für den Tumorprogress, also für die Streuung in das umliegende Gewebe oder in entfernte Organe, müssen Tumorzellen in der Lage sein, sich fortzubewegen. Tumorzellen zeichnen sich daher durch eine erhöhte Migration aus. In einem Wound-healing-Assay wurde untersucht, wie schnell 786-O-Zellen einen Spalt in einer konfluenten Zellschicht durch Migration wieder schließen können. In der Abbildung 21 ist dies demonstriert: Der Spalt sowohl von Zellen mit überexprimierter miR-141 als auch von Zellen mit überexprimierter miR-145 ist nach 15 h noch signifikant weiter als der von Kontrollzellen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beiden untersuchten miRNAs eine Hemmung des migratorischen Verhaltens von Tumorzellen induzieren.

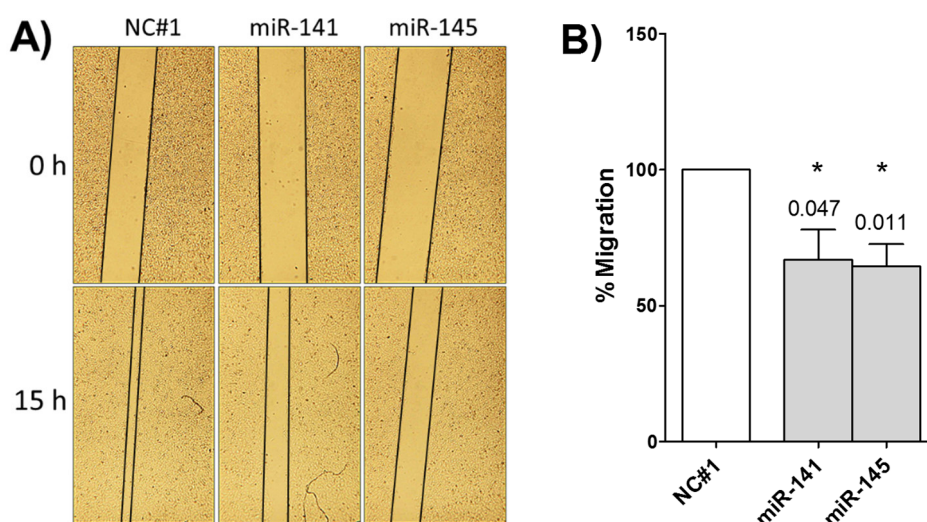


Abbildung 21. Effekt von miR-141 und miR-145 auf die Migration von 786-O-Zellen.

Nach der Transfektion mit den miRNAs wurden die 786-O-Zellen bis zu einer 100 %igen Konfluenz kultiviert und anschließend mit einer Pipettenspitze jeweils zwei Spalten in die einlagige Zellschicht gekratzt. A) Bei 0 h und 15 h wurde jeweils ein Foto derselben Positionen aufgenommen. B) Anhand der Fotos wurde berechnet, wie weit der Spalt bei transfizierten Zellen nach 15 h bereits zugewachsen war, relativ zu der Negativkontrolle (Mittelwert \pm SEM). NC#1=Negativkontrolle; t-test (one-tailed); *p < 0.05; n = 3.

Da der Effekt einer miRNA oft nur sehr gering ist, wurde zusätzlich in einem Migrations- und Invasionsassay untersucht, ob die kombinierte Überexpression der beiden miRNAs durch synergistische Wirkung eine stärkere Inhibierung der migratorischen und invasiven Eigenschaften zur Folge hat. Hierbei wurde der Einfluss der beiden miRNAs auf die Migrationsrate von Tumorzellen durch eine Membran sowie die Invasionsrate durch eine mit Matrigel beschichtete Membran untersucht. Auch hier konnte die Reduktion der Migration in 786-O-Zellen durch die Überexpression der einzelnen miRNAs gezeigt werden, wobei diese nur bei miR-141 signifikant war. Die Kombination von miR-141 und miR-145 ergab zudem einen leicht stärkeren Effekt als die einzelnen miRNAs. Dies führte zu einer Reduktion der Migration um etwa 25 % (Abbildung 22A). Bei der Untersuchung der Zellinvasion konnte durch die miR-141 eine über 50 %ige Reduktion der Invasion in 786-O-Zellen erzielt werden. Auch die miR-145 zeigte hier eine Tendenz zur Hemmung der Invasion. Die Kombination beider miRNAs hatte jedoch keine zusätzliche Steigerung der Inhibition zur Folge (Abbildung 22B).

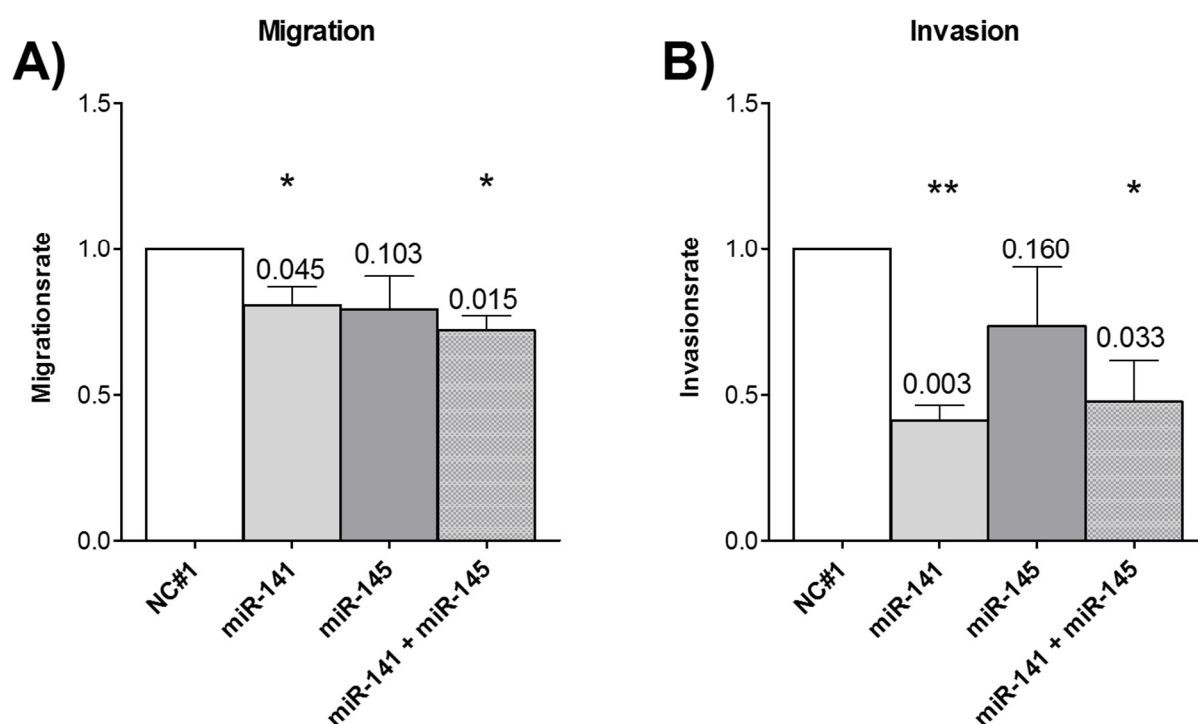


Abbildung 22. Effekt von miR-141 und miR-145 auf die Zellmigration und -invasion von 786-O-Zellen.

24 h nach Transfektion mit den miRNAs wurden 786-O-Zellen zur Analyse der A) Migration in unbeschichtete und zur Analyse der B) Invasion in mit Matrigel beschichtete Inserts ausgesät. Anschließend wurde 20 h nach Aussaat die gewanderten Zellen an der Unterseite der Inserts detektiert. Die Rate der Migration/Invasion wurde jeweils zur entsprechenden Negativkontrolle berechnet (Mittelwert \pm SEM). NC#1 = Negativkontrolle; t-test (one-tailed); *p < 0.05; **p < 0.01; n=3.

Durch diese funktionellen Analysen konnte gezeigt werden, dass die beiden im Nierenzellkarzinom durch epigenetische Mechanismen herunterregulierten miR-141 und miR-145 über tumorsuppressive Eigenschaften verfügen. So ist die miR-141 in der Lage, sowohl die Proliferation, als auch die Migration und Invasion von Tumorzellen zu hemmen. Die miR-145 spielt hingegen keine Rolle bei der Zellproliferation. Sie hat auch einen leicht inhibierenden Effekt auf das migratorische Verhalten von Tumorzellen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Kombination beider miRNAs eine Tendenz zu einem synergistischen Effekt zeigt und somit zu einer verstärkten Hemmung migratorischer Prozesse führt.

3.4. Targets epigenetisch regulierter microRNAs

Um die genaue Aufgabe einzelner miRNAs in der Zelle und ihre Rolle bei der Entstehung und Progression des Nierenzellkarzinoms zu verstehen, müssen zunächst deren Targets identifiziert und charakterisiert werden. Eine miRNA kann dabei eine Reihe unterschiedlicher Targets regulieren. Im Gegenzug kann ein Target aber auch von verschiedenen miRNAs gebunden und gehemmt werden. Der Effekt einer einzelnen miRNA fällt oft nur sehr gering aus. Durch die gleichzeitige Wirkung mehrerer miRNAs auf ein Target kann die Hemmung des entsprechenden Transkripts jedoch verstärkt werden. In diesem Teil der Arbeit sollten neue, bisher für das klarzellige Nierenzellkarzinom nicht beschriebene Targets für die beiden miRNAs miR-141 und miR-145 identifiziert und der Zusammenhang zwischen miRNA und Target im Patienten untersucht werden. Dies bezog sich sowohl auf Targets, die nur jeweils von der einzelnen miRNA beeinflusst werden, als auch für gemeinsame Targets von beiden miRNAs.

3.4.1. *In-silico*-Targetsuche

Wie in der Einleitung erläutert, ist für die posttranskriptionelle Hemmung von Targets durch miRNAs in erster Linie die Sequenzkomplementarität zwischen 3'UTR der mRNA und der *seed*-Sequenz der miRNA entscheidend. Für die Identifikation von potenziellen Targets sind *in-silico*-Vorhersagen durch Sequenzvergleiche erforderlich. Es gibt eine Reihe von Algorithmen, mit deren Hilfe die Suche nach miRNA-Bindestellen in mRNA-Transkripten auf Grundlage unterschiedlicher Kriterien möglich ist. Die Targetsuche dieser Arbeit erfolgte mit dem Programm miRWalk, das auf Basis der komplementären Basenpaarung und statistischen Modellen potenzielle Interaktionen vorhersagt und zudem die Targetvorhersagen unterschiedlicher Plattformen vergleicht (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>) (Dweep et al. 2011).

Die Suche nach möglichen Targets wurde für die beiden epigenetisch regulierten miR-141 und miR-145 zunächst einzeln durchgeführt, wobei die Suchkriterien Gene Region: 2000 upstream flanked; 3'UTR und Options: longest transcript; min seed length = 7; p-value ≤ 0.05 gewählt wurden. Hierbei ergaben sich für miR-141 1099 Targets und für miR-145 947 Targets. Diese beiden Listen überschneiden sich in 100 Targets, die möglicherweise durch beide miRNAs reguliert werden können (Anhang 4). Aus dieser Liste der potenziellen gemeinsamen Targets wurden anhand von Literaturrecherchen Targets zur weiteren Untersuchung ausgewählt (Tabelle 10). Zudem wurden aufgrund von Literaturdaten einige potenziell interessante Targets für die einzelnen miRNAs ausgewählt, wobei auch Targets aus dem Vergleich anderer Plattformen berücksichtigt wurden. Die Auswahl der Targets erfolgte dabei mit dem Fokus auf Genen, die im Zusammenhang mit Migrationseigenschaften von Karzinomzellen bekannt sind oder im Zusammenhang mit anderen typischen Karzinomcharakteristika beschrieben wurden.

3.4.2. Regulation ausgewählter Targets durch miR-141 und miR-145 in RCC-Zelllinien

Um zu testen, ob die miRNA einen Einfluss auf ein entsprechendes Target in Nierenkarzinomzellen hat, wurden die miRNAs, wie bei den funktionellen Analysen beschrieben, in Zellkulturen überexprimiert und der Effekt auf die Target-Expression ermittelt. Die untersuchten Targets wurden fast alle in den beiden verwendeten Zelllinien 786-O und ACHN auf einem relativ hohen Niveau exprimiert. Die einzige Ausnahme war dabei HS6ST2, welches in ACHN-Zellen nicht detektierbar war.

Die Abbildung 23 und 24 (siehe auch Anhang 5 und 6) verdeutlichen, dass sowohl miR-141 als auch miR-145 eine Reihe der vorhergesagten Targets in ihrer Expression stark hemmen. Der Übersichtlichkeit halber ist dies in Tabelle 10 zusammengefasst und nur für die Targets mit statistisch gesicherten Hemmeffekten in den Abbildungen dargestellt. Die Überexpression der miR-141 hemmte die Expression der Targets EAPP, HS6ST2, LOX, SLC16A3, TGFB2, TGFBR1 und VRK2, wobei dies nur bei LOX und TGFB2 in beiden Zelllinien beobachtet werden konnte. Die Überexpression der miR-145 zeigte dagegen bei den Targets SERPINE1, TLR4, HS6ST2, NRP2 und TGFB2 in einer der Zelllinien und bei den Targets BIRC2, CDH2, MAP4K4, NRAS, TNFRSF10B, EAPP, LOX, und VRK2 in beiden Zelllinien eine Reduktion der Expression. Bei den anderen Targets war kein Effekt zu beobachten (Tabelle 10). Da MAP4K4 in der Literatur zusätzlich als Target der miR-141 beschrieben wurde (Zhao et al. 2013), wurde auch der Effekt der miR-141 auf MAP4K4 bestimmt. Dabei konnte jedoch kein regulatorischer Einfluss von miR-141 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Aus der Liste der gemeinsamen Targets zeigten EAPP, HS6ST2, LOX, TGFB2 und VRK2 durch jeweils beide miRNAs eine Reduktion der Expression wobei der Effekt aber zum Teil nur sehr gering war. Diese Targets wurden zusätzlich in Zellen bestimmt, in welchen miR-141 und miR-145 gleichzeitig überexprimiert wurde (Abbildung 24). Bei den Targets HS6ST2 und LOX konnte durch die kombinierte Überexpression der beiden miRNAs eine signifikant stärker verminderte Target-Expression beobachtet werden als durch die einzelnen miRNAs. Die Expression von HS6ST2 wurde dabei bereits durch die einzelnen miRNAs um etwa 30 % reduziert. Die Kombination der miRNAs bewirkte dann sogar eine Hemmung der Expression um mehr als die Hälfte. Die Stärke des inhibierenden Effekts auf die LOX-Expression fiel in beiden Zelllinien unterschiedlich aus. Die miR-141 reduzierte in beiden Zelllinien nur geringfügig die Expression von LOX. Der Effekt von miR-145 war jeweils stärker und reduzierte die Expression in 786-O-Zellen sogar um etwa 50 %. In beiden Zelllinien war die Hemmung durch die kombinierte Überexpression jedoch nochmals verstärkt.

Eine sehr starke Inhibierung war bei MAP4K4 durch miR-145 und bei TGFB2 durch miR-141 zu beobachten. Hier zeigte die Überexpression von miR-145 bzw. miR-141 eine Reduktion der Target-Expression in jeweils beiden Zelllinien um etwa 50 % (Abbildung 23, Abbildung 24).

Tabelle 10. Effekt auf die potenziellen Targets durch Überexpression von miR-141 oder miR-145.

Target von miR-141	786-O	ACHN		
CDC42EP3	-	-		
LOXL1	-	-		
MAP2K4	-	-		
TGFBR1	-	+		
Target von miR-145	786-O	ACHN		
BIRC2	+	+		
BIRC5	-	-		
CDH2	+	+		
MAP4K4	+	+		
NRAS	+	+		
SERPINE1	-	+		
TLR4	-	+		
TNFRSF10B	+	+		
Targets von miR-141 und miR-145	miR-141		miR-145	
	786-O	ACHN	786-O	ACHN
EAPP	-	+	+	+
FRMD4A	-	-	-	-
HS6ST2	+	n.d.	+	n.d.
ITGB3	-	-	-	-
LOX	+	+	+	+
NRP2	-	-	+	-
SLC16A3	+	-	-	-
TGFB2	+	+	+	-
TMEM16F	-	-	-	-
TNFSF4	-	-	-	-
VRK2	-	+	+	+

+ = signifikante Reduktion der Target-mRNA nach Überexpression der entsprechenden miRNA

- = keine signifikante Reduktion der Target-mRNA nach Überexpression der entsprechenden miRNA

n.d. = nicht detektierbar

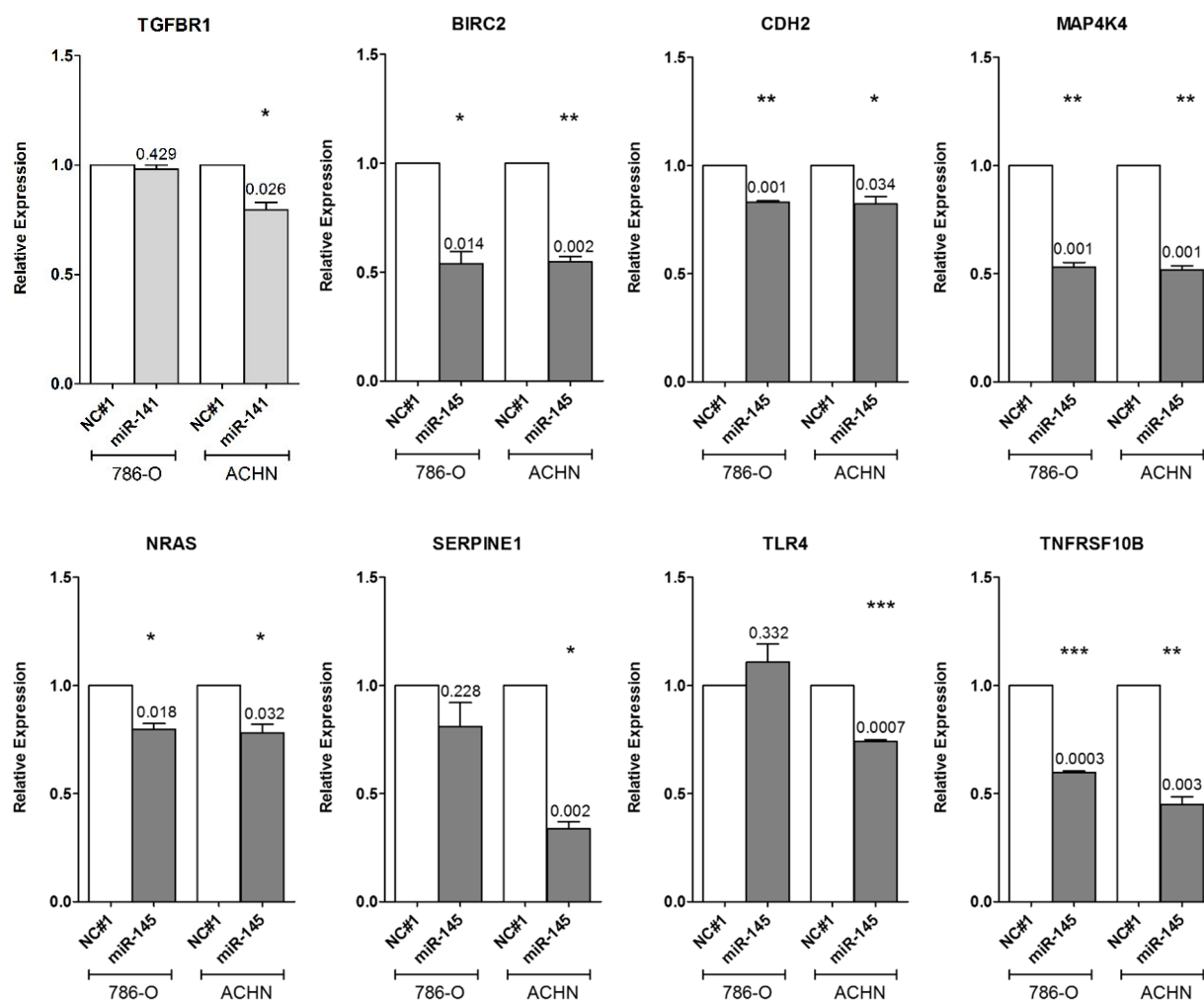


Abbildung 23. Effekt der Überexpression von miR-141 oder miR-145 auf potenzielle Targets.

Die miR-141 oder miR-145 wurden für 48 h in den Nierentumorzelllinien 786-O und ACHN überexprimiert und anschließend der Effekt auf die potenziellen Targets auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR bestimmt. Angegeben ist die relative Expression im Vergleich zur Negativkontrolle (Mittelwert \pm SEM). NC#1 = Negativkontrolle; n = 3; t-test (two-tailed); *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

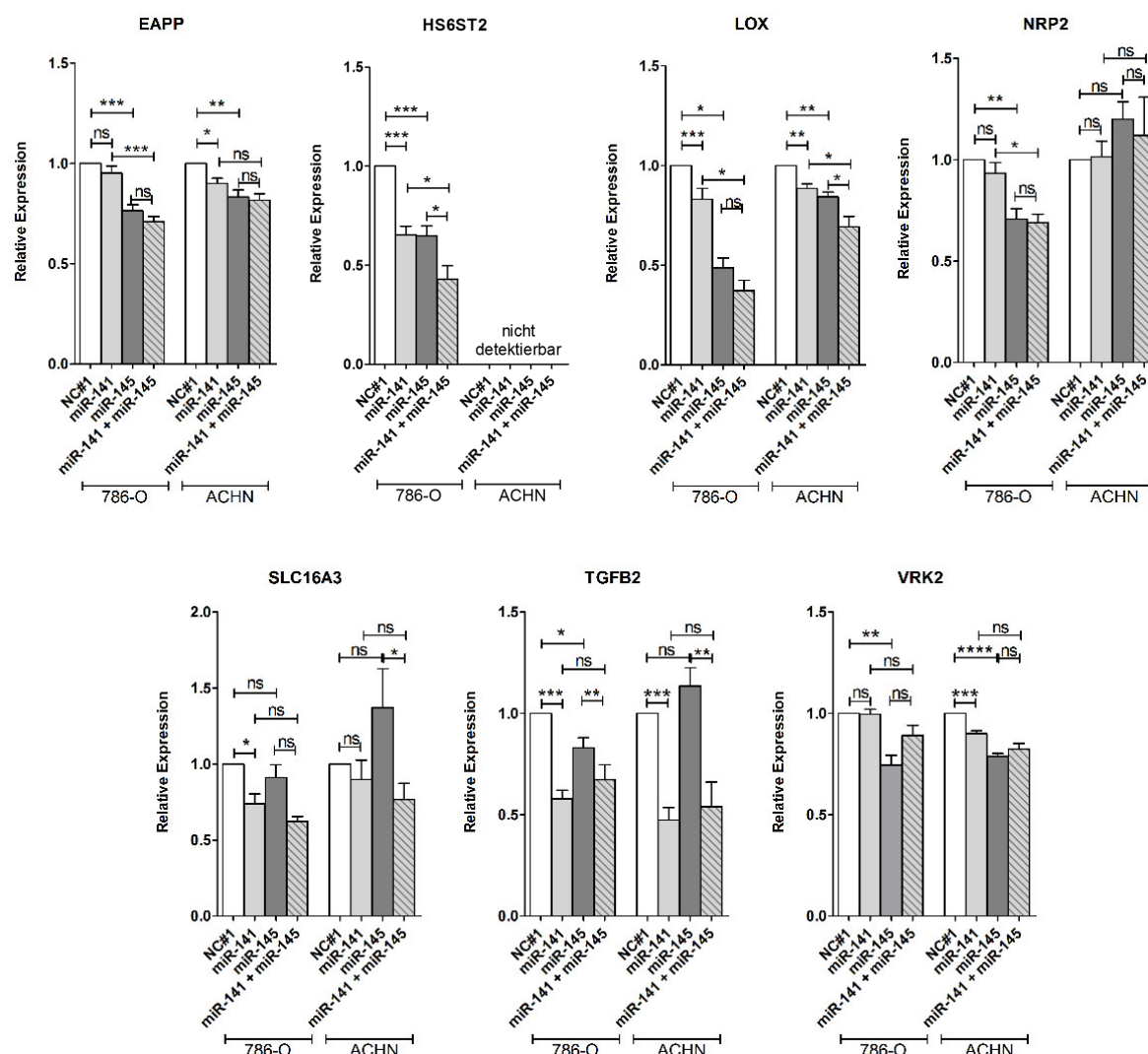


Abbildung 24. Effekt der Überexpression von miR-141 und/oder miR-145 auf potenzielle gemeinsame Targets.

Die miR-141 und/oder miR-145 wurden für 48 h in den Nierentumorzelllinien 786-O und ACHN überexprimiert und anschließend der Effekt auf die potenziellen Targets auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR bestimmt. Angegeben ist die relative Expression im Vergleich zur Negativkontrolle (Mittelwert \pm SEM). NC#1 = Negativkontrolle; n = 3; t-test (two-tailed); *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Aufgrund des synergistischen Effekts der miR-141 und miR-145 auf HS6ST2 und LOX wurden diese beiden als gemeinsame Targets für weitere Untersuchungen in Patienten ausgewählt. Zudem wurde auch MAP4K4 als Target der miR-145 in die weiteren Analysen eingeschlossen, da es offensichtlich sehr stark durch die miRNA reguliert wurde und noch relativ wenig über dessen Rolle beim ccRCC bekannt ist.

3.4.3. Expression und Korrelation der Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 und microRNAs miR-141 und miR-145 beim ccRCC

Die vorhergehenden Zellkulturexperimente hatten gezeigt, dass miR-141 und/oder miR-145 in der Lage sind, die Expression der Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 in Nierentumorzellen zu hemmen. Nun sollte überprüft werden, inwieweit diese drei Targets in ccRCC-Patienten reguliert vorliegen und in welchem Zusammenhang sie mit der miRNA-Expression sowie mit klinischen Daten stehen. Hierfür wurde eine Kohorte aus 27 Patienten zusammengestellt. Diese setzte sich aus Tumoren mit 11x pT1, 2x pT2 und 14x pT3 zusammen. 20 Tumore wiesen ein Grading von G2 und 7 ein Grading G3 auf. 12 der untersuchten Tumore waren zum Zeitpunkt der Operation bereits metastasiert. Es wurde sowohl die miRNA- als auch die Target-Expressionen in den gepaarten Normal- und Tumorgeweben mittels RT-qPCR bestimmt.

Expression der miRNAs miR-141 und miR-145 und der Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 im ccRCC

Wie in Profilinganalysen nachgewiesen werden konnte, sind miR-141 und miR-145 in Gewebe von ccRCC verringert exprimiert (Wotschofsky, Liep et al. 2012). Zunächst wurde überprüft, wie sich die miRNA-Expression in dem hier analysierten Patientenkollektiv darstellt.

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, zeigten beide miRNAs eine verringerte Expression im Tumorgewebe der untersuchten Patienten. Bei miR-141 war die Expression im Tumorgewebe um das 19-Fache verringert (Abbildung 25A). Diese Herunterregulation war bei allen gepaarten Patientenproben zu beobachten (Abbildung 25B). Zwischen den Gruppen M0 und M1 war jedoch kein Unterschied in der miR-141-Expression zu beobachten (Abbildung 25C). Die miR-145 zeigte in der hier bestimmten kleinen Gruppe von Patienten ebenfalls eine verringerte Expression im Tumorgewebe um das 1.5-Fache (Abbildung 25A). In metastasierten Tumoren schien die Expression dabei etwas höher zu sein als in nicht-metastasierten Tumoren (Abbildung 25C). Im direkten Vergleich der gepaarten Proben war offensichtlich, dass zwar bei dem Großteil der Patienten die miR-145 im Tumor auf einem geringeren Niveau als im Normalgewebe exprimiert wird, jedoch eine erhöhte Expression bei fünf der 27 Patienten (entspricht fast 20 %) auftrat. Vier dieser fünf Patienten wiesen dabei Metastasen auf (Abbildung 25B). Ohne diese fünf Patienten entspräche die Expression der metastasierten Tumoren aber ebenfalls der der nicht-metastasierten.

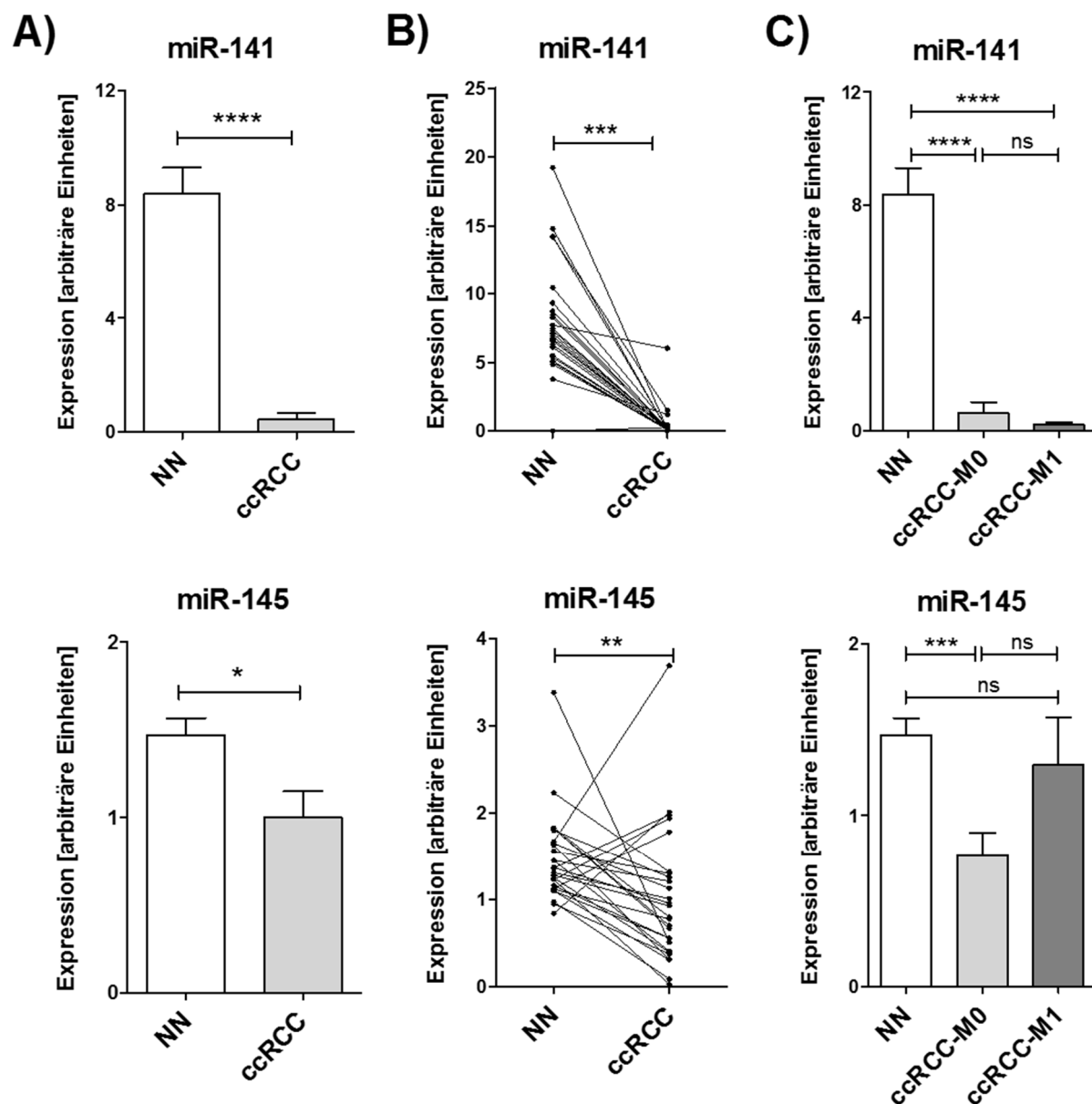


Abbildung 25. Expression der microRNAs miR-141 und miR-145 in Nierenzellkarzinomgewebe.

Ermittlung der Expression von miR-141 und miR-145 in Normal- und Tumorgewebe der Niere von 27 Patienten mit ccRCC mittels RT-qPCR. A) zeigt die Expressionsunterschiede zwischen den gepaarten Normal- und Tumorgewebeproben. In B) ist die Expression der Targets in den einzelnen Patienten im direkten Vergleich dargestellt. C) zeigt die Tumorgewebeproben in ccRCC-M0 und ccRCC-M1 aufgesplittet. NN = Normales Nierengewebe; ccRCC-M0 = Gewebe von primären ccRCC von Patienten ohne diagnostizierte Metastasen; ccRCC-M1 = Gewebe von primären ccRCC von Patienten mit diagnostizierten Metastasen; gepaarte Proben: Wilcoxon-Test; ungepaarte Proben: Mann-Whitney-Test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns = nicht signifikant.

Aufgrund der verringerten Expression von miR-141 und miR-145 im ccRCC-Gewebe, wurde eine erhöhte Target-Expression erwartet. Dementsprechend zeigten die beiden Targets LOX und MAP4K4 auch eine erhöhte Expression im malignen Gewebe. LOX war dabei sehr stark um etwa das 20-Fache überexprimiert (Abbildung 26A). Besonders interessant war, dass sich die Expression hier zwischen Tumoren mit und ohne Metastasen signifikant unterschieden, wobei die Expression in metastasierten Tumoren deutlich höher lag (Abbildung 26C). Es schien somit zu einem Anstieg der LOX-Expression im Laufe der Tumorprogression zu kommen.

Auch MAP4K4 zeigte insgesamt eine um etwa 1.5-fach erhöhte Expression im Tumorgewebe, die aber in M0- und M1-Tumoren in etwa gleich war (Abbildung 26). Der Großteil der Patienten zeigte eine Überexpression von MAP4K4. Es gab jedoch auch wieder eine Reihe von Tumoren, die eine verringerte Expression im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe aufwiesen. Insgesamt war diese inverse Regulation bei fünf Patienten (entspricht fast 20 %) zu finden, vier dieser fünf Patienten waren zum Zeitpunkt der Nephrektomie bereits metastasiert (Abbildung 26B).

Das dritte untersuchte Target HS6ST2 zeigte dagegen eine sehr starke Reduktion der Expression im Tumorgewebe aller untersuchten Patienten (Abbildung 26). Im Tumorgewebe war die Expression dabei um das 50-Fache niedriger als im Normalgewebe. Es bestand aber kein Unterschied zwischen bereits metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden diese mit den Daten eines in unserer Arbeitsgruppe bereits vorhandenen mRNA-Microarrays verglichen. Auch hier zeigten LOX und MAP4K4 eine erhöhte und HS6ST2 eine verringerte Expression im Tumorgewebe (Daten nicht gezeigt).

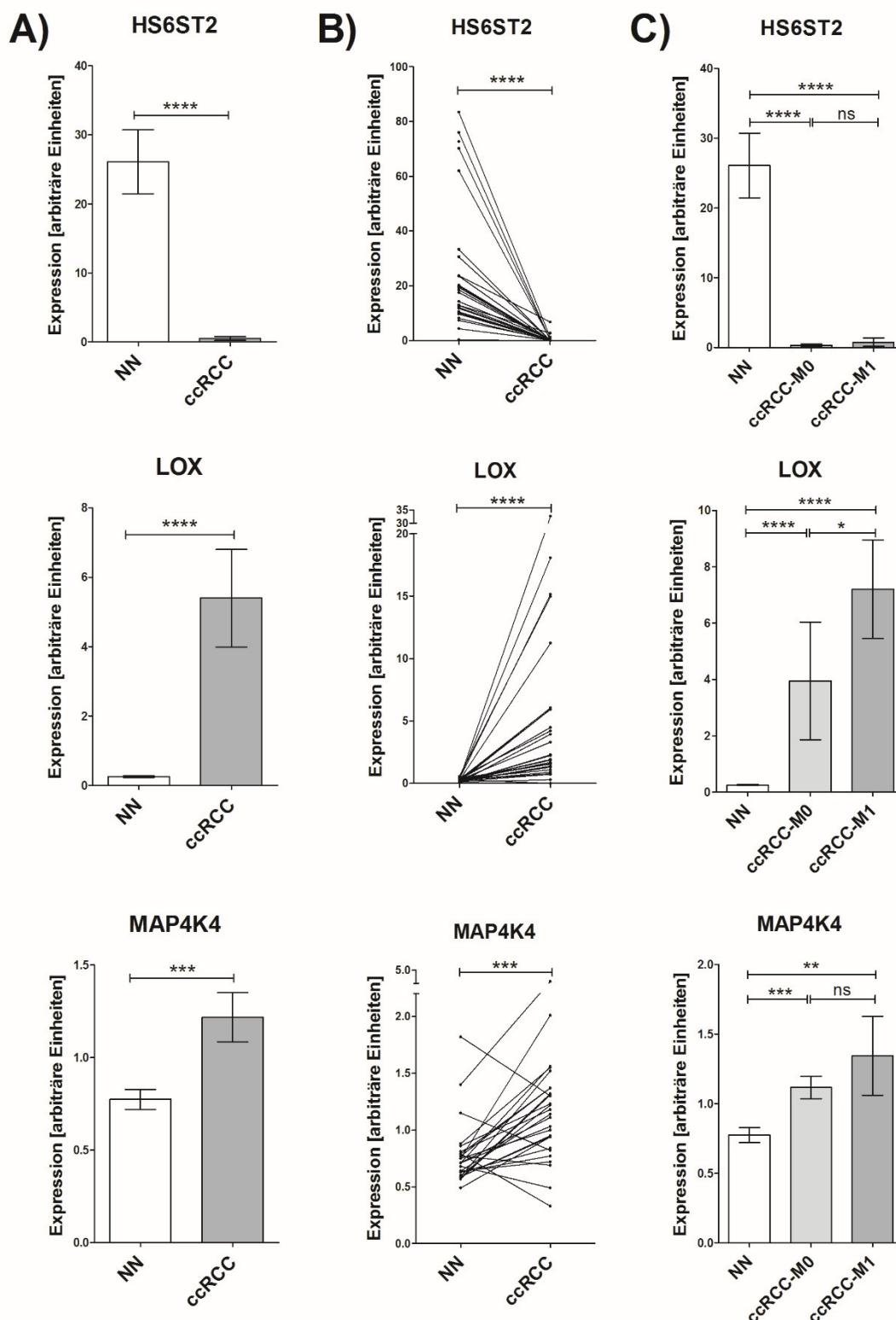


Abbildung 26. Expression der Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 in Nierenzellkarzinomgewebe.

Ermittlung der Expression der Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 in Normal- und Tumorgewebe der Niere von 27 Patienten mit ccRCC mittels RT-qPCR. A) zeigt die Expressionsunterschiede zwischen den gepaarten Normal- und Tumorgeweben. In B) ist die Expression der Targets in den einzelnen Patienten im direkten Vergleich dargestellt. C) zeigt die Tumorgeweben in ccRCC-M0 und ccRCC-M1 aufgesplittet. NN = Normales Nierengewebe; ccRCC-M0 = Gewebe von primären ccRCC von Patienten ohne diagnostizierte Metastasen; ccRCC-M1 = Gewebe von primären ccRCC von Patienten mit diagnostizierten Metastasen; gepaarte Proben: Wilcoxon-Test; ungepaarte Proben: Mann-Whitney-Test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns = nicht signifikant.

Korrelation zwischen den Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 und den microRNAs miR-141 und miR-145 im ccRCC

Bei der weiteren Analyse der Daten konnte eine enge Korrelation der Target-Expressionen in Normal- und Tumorgewebe sowohl mit der Expression der miR-141 als auch mit der miR-145 nachgewiesen werden (Abbildung 27). Die Korrelation zwischen den beiden Targets LOX und MAP4K4 zu den jeweiligen miRNAs war dabei negativ gerichtet. Dies untermauert den postulierten Zusammenhang zwischen verringert exprimierten miRNAs und der damit einhergehenden erhöhten Expression der entsprechenden Targets. Zwischen HS6ST2 und den beiden miRNAs bestand ebenfalls eine starke Korrelation, die jedoch positiv und damit im Widerspruch zu den Zellversuchen war.

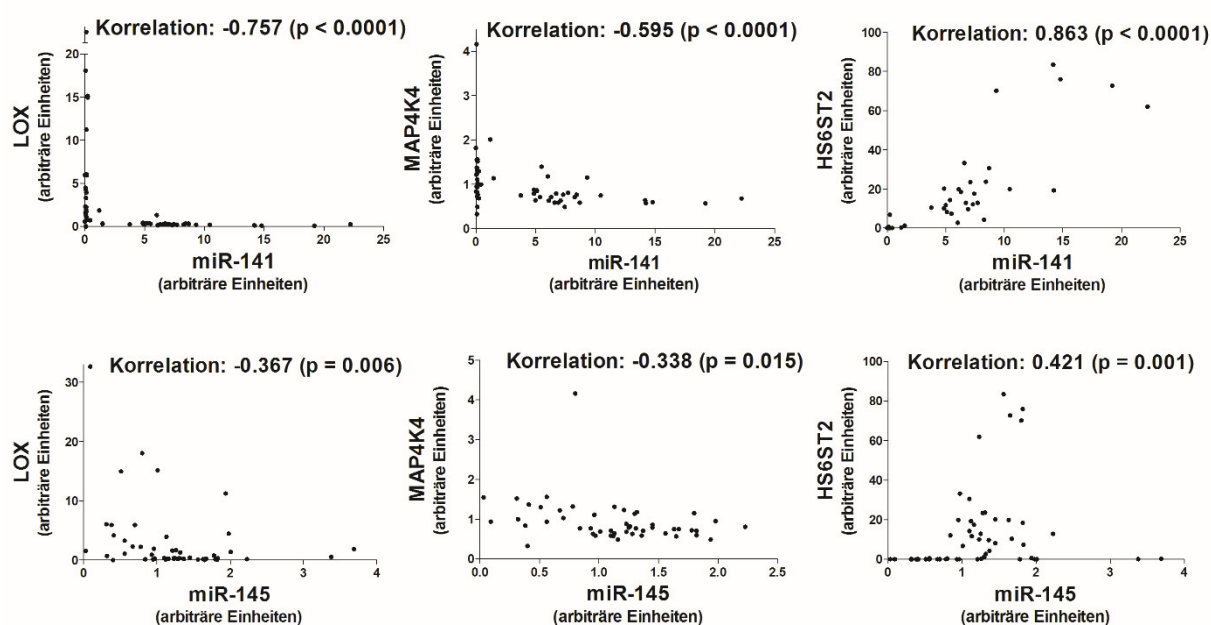


Abbildung 27. Korrelation der Expression zwischen den Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 und den microRNAs miR-141 und miR-145 in Nierenzellkarzinomgewebe.

Korrelation der Expressionen in ccRCC- und normalen Nierengewebe. Die Expression von LOX und MAP4K4 zeigen jeweils eine negative Korrelation zur miR-141 und miR-145-Expression. HS6ST2 zeigte dagegen eine starke positive Korrelation zu den miRNAs. Berechnungen mit dem Spearman-Rank-Korrelationskoeffizienten.

Diagnostisches Potenzial der HS6ST2-, LOX-, MAP4K4-, miR-141- und miR-145-Expression

Um zu testen, ob die untersuchten Targets und miRNAs in der Lage sind, zwischen Normal- und Tumorgewebe bzw. zwischen nicht-metastasierten und metastasierten Nierentumoren zu diskriminieren, wurde eine ROC-Analyse durchgeführt und der Flächenwert unter der Kurve (AUC) bestimmt (Tabelle 11). Dieser Ansatz ermöglicht es, das diagnostische Potenzial von Biomarkern abzuschätzen.

Wie schon aus den vorher ermittelten Expressionsdaten zu erwarten, waren alle drei Targets und die beiden miRNAs geeignete Marker, um zwischen Normal- und Tumorgewebe zu differenzieren. Eine Differenzierung zwischen Patienten mit lokal begrenztem Tumor gegenüber Patienten mit bereits vorliegenden Metastasen zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Tumors war jedoch nur mit LOX zufriedenstellend möglich. Mithilfe der übrigen Targets bzw. miRNAs war eine Trennung dieser beiden Gruppen nicht oder nur bedingt möglich (Tabelle 11).

Tabelle 11. ROC-Analyse zur Vorhersage des diagnostischen Potenzials.

Marker	AUC (95 % CI)	
	Trennung von NN und ccRCC	Trennung von ccRCC-M0 und ccRCC-M1
HS6ST2	0.974 (0.941 - 1.000) ^{****}	0.697 (0.492 - 0.902) ^{ns}
LOX	0.849 (0.725 - 0.973) ^{****}	0.811 (0.644 - 0.979) ^{**}
MAP4K4	0.773 (0.635 - 0.911) ^{**}	0.539 (0.302 - 0.776) ^{ns}
miR-141	0.912 (0.815 - 1.000) ^{****}	0.539 (0.315 - 0.763) ^{ns}
miR-145	0.711 (0.565 - 0.857) ^{**}	0.694 (0.492 - 0.897) ^{ns}

AUC = area under the curve

NN = Niere Normalgewebe

ccRCC = Gewebe von klarzelligen Nierenzellkarzinomen

ccRCC-M0 = Gewebe von primären ccRCC von Patienten ohne diagnostizierte Metastasen

ccRCC-M1 = Gewebe von primären ccRCC von Patienten mit diagnostizierte Metastasen

3.4.4. Immunhistochemische Untersuchung von LOX und MAP4K4 an Gewebeschnitten des Nierenzellkarzinomes

Da die Targets LOX und MAP4K4 der epigenetisch herunterregulierten miR-141 und miR-145 im Tumorgewebe von ccRCC-Patienten auf mRNA-Ebene stark überexprimiert waren und über diagnostisches Potenzial verfügten, sollte im letzten Teil der Arbeit der Zustand auf Proteinebene untersucht werden. Um möglichst viele Patienten parallel analysieren zu können, wurde ein TMA mit jeweils 3 Spots von insgesamt 322 ccRCC-Fällen verwendet (Tabelle 12). Der TMA wurde jeweils für LOX oder MAP4K4 immunhistochemisch gefärbt und anschließend in Zusammenarbeit mit einem Pathologen (Herr Dr. Kilic, Charité-Universitätsmedizin Berlin) ausgewertet. Da HS6ST2 auf mRNA-Ebene entgegen unserer Hypothese herunterreguliert war und außerdem ein validierter Antikörper in der Bearbeitungszeit nicht verfügbar war, wurde dieses Target hier auf Protein-Ebene nicht weiter untersucht.

Tabelle 12. Klinische und histopathologische Charakterisierung der untersuchten Patienten (TMA).

Eigenschaft		ccRCC Patienten (n = 322)
Alter	Median	61
	Range	25 - 84
Geschlecht	weiblich	115
	männlich	207
pT-Stadium	pT1	193
	pT2	15
	pT3	111
	pT4	3
Grading	G1	47
	G2	234
	G3	38
	G4	3
Resektionsrand	R0	287
	R1	17
	R2	2
	Rx	16
N-Status	N0	179
	N1	18
	Nx	125
M-Status	M0	275
	M1	30
	Mx	17

Zur Charakterisierung des verwendeten Patientenkollektivs wurde eine Analyse der Gesamtüberlebenszeit nach Nephrektomie in Abhängigkeit von den pathologischen Parametern pT-Stadium, Fuhrman-Grad und Resektionsrand-Status durchgeführt. Wie aus den Kaplan-Meier-Analysen klar hervorgeht (Abbildung 28), ist der klinische Endpunkt "Überleben" stark von allen drei Parametern abhängig. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse aus anderen Studien. Sie dienen hier lediglich als Beleg dafür, dass die untersuchte Patientenkohorte repräsentativ ist, um prognostische Aussagen mit anderen Kenngrößen zur Frage dieses klinischen Endpunktes treffen zu können. Im vorliegenden Fall bezieht sich dies, wie oben bereits erwähnt, auf die immunhistochemischen Expressionsmuster von LOX und MAP4K4.

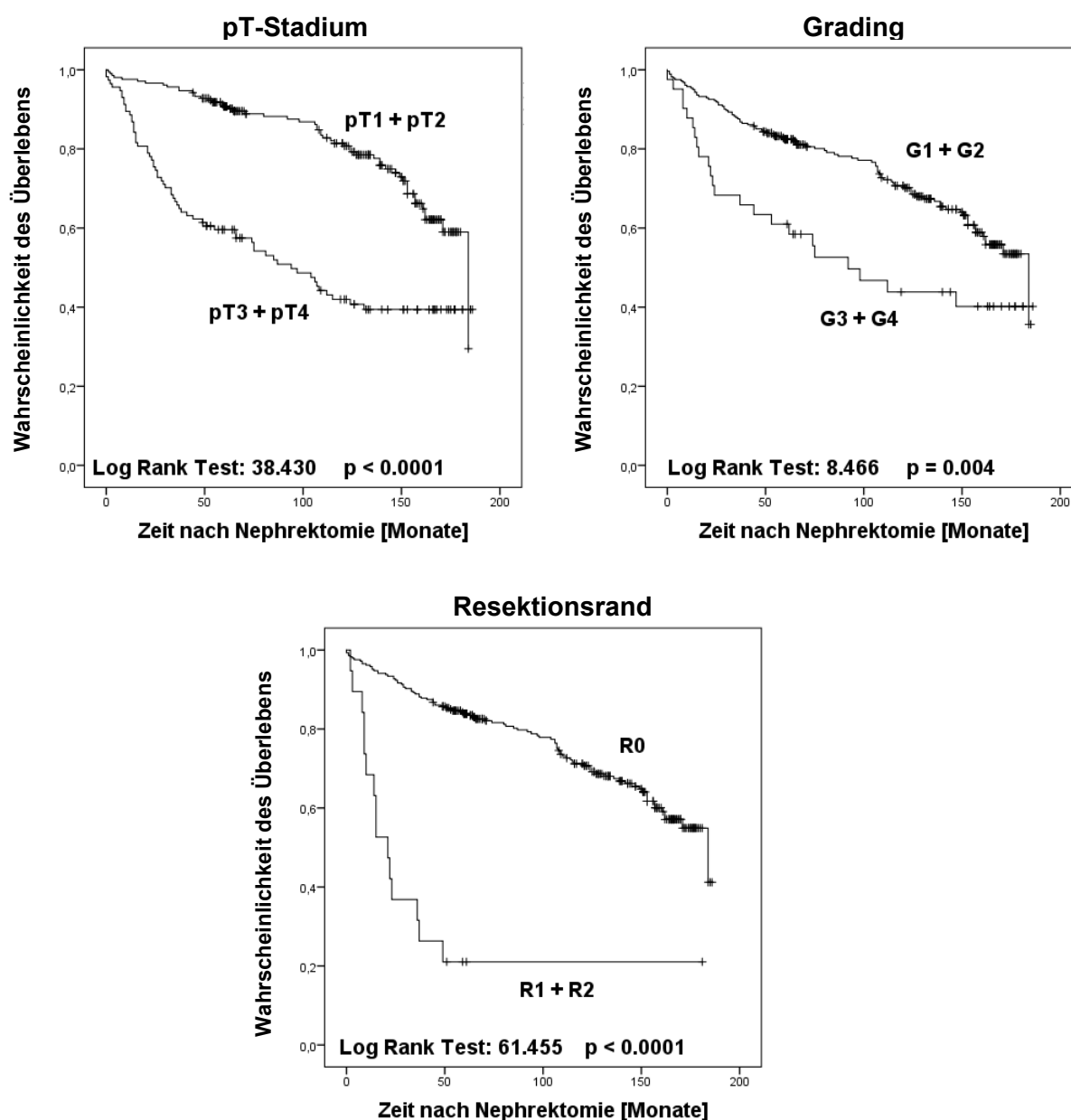


Abbildung 28. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit in Abhängigkeit von pathologischen Kenngrößen. Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit nach Nephrektomie in Abhängigkeit von pT-Stadium, Fuhrman-Grad und Resektionsrand-Status (R).

LOX-Expressionsmuster im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Die LOX-Färbung von normalem Nierengewebe zeigt das typische Muster eines sekretierten Proteins. Es ist eine intensive Färbung der Lumen und Zellzwischenräume zu erkennen. Zudem war die Färbung apikal sowie punktuell im Zytoplasma, vermutlich assoziiert mit dem endoplasmatischen Retikulum, zu finden.

Die Bewertung der Färbung des Tumorgewebes erfolgte einzeln für die apikale und zytoplasmatische Lokalisation mit jeweils negativ, schwach positiv und stark positiv (Abbildung 29) sowie perinukleär mit negativ und positiv (Bilder nicht gezeigt).

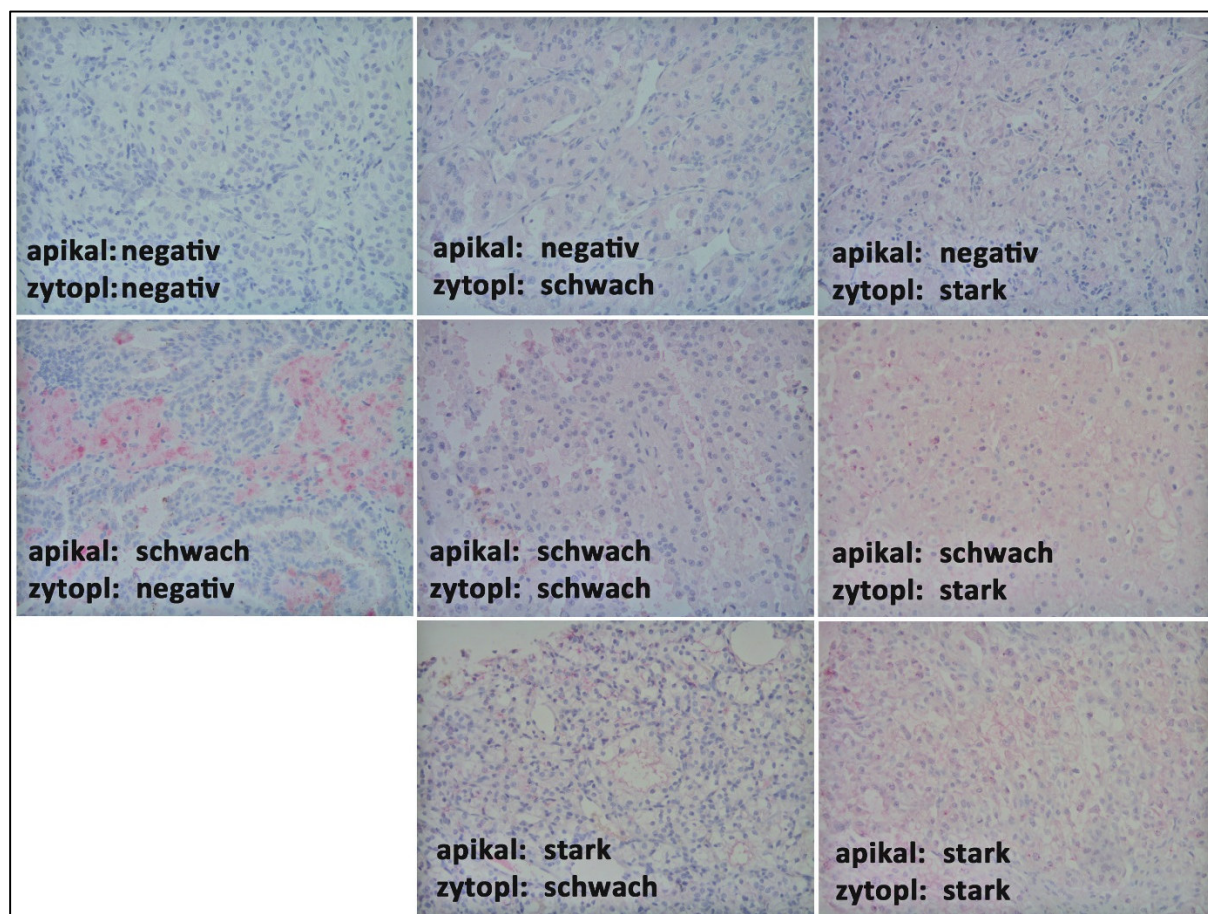


Abbildung 29. LOX-Expression im Gewebe von klarzelligen Nierenzellkarzinomen.

Die Intensität der apikalen und zytoplasmatischen LOX-Färbung wurde jeweils nach folgendem Schema bewertet: negativ, schwach positiv und stark positiv. Es gab dabei kein ccRCC-Gewebe, das sowohl apikal stark positiv und gleichzeitig zytoplasmatisch negativ war. Vergrößerung 200x.

Insgesamt war die LOX-Färbung bei 301 Patienten auswertbar. Der Großteil der Tumore zeigte dabei eine apikal negative und zytoplasmatisch schwach positive Färbung. Eine apikal starke oder zytoplasmatisch negative Färbung kam dagegen nicht vor.

Um zu überprüfen, ob eine bestimmte Lokalisation von LOX in einem Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben der ccRCC-Patienten steht, wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Hierbei konnte jedoch keine Abhängigkeit der Überlebenszeit von der Expressionsstärke der einzelnen Bereiche festgestellt werden (Abbildung 30).

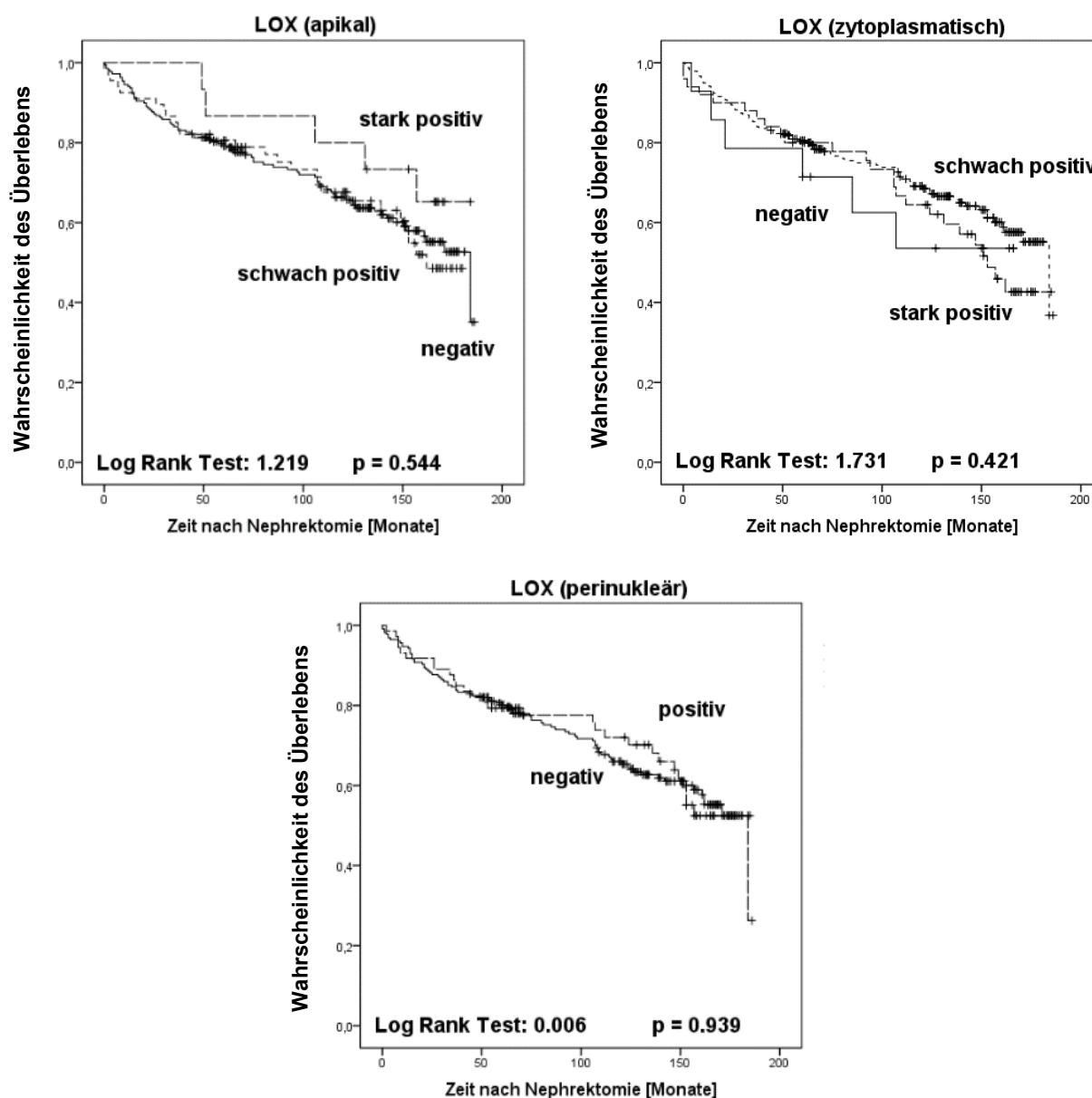


Abbildung 30. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der LOX-Expression.

Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit nach Nephrektomie zur Bewertung der prognostischen Relevanz der Expressionsstärke der einzelnen LOX-Lokalisationen: apikal, zytoplasmatisch und perinukleär.

Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisierung von LOX war es möglich, diverse Expressionsmuster zu untersuchen. Als sehr interessant erwies sich dabei die Einteilung der Tumore in jene, deren apikale LOX-Expression größer war als die zytoplasmatische ($LOX_a > LOX_z$) und jene, deren apikale LOX-Expression kleiner oder gleich der zytoplasmatischen LOX-Expression war ($LOX_a \leq LOX_z$). Beim Vergleich der Gesamtüberlebenszeit der Patienten dieser beiden Gruppen konnte festgestellt werden, dass Patienten mit erhöhter apikaler LOX-Expression ($LOX_a > LOX_z$) eine deutlich bessere Überlebensrate zeigten als Patienten, deren zytoplasmatische LOX-Expression größer oder gleich der apikalen Expression war.

($LOX_a \leq LOX_z$) (Log Rank Test: $p = 0.046$) (Abbildung 31). Klinisch gesehen ist die Unterteilung von Patienten mit nicht-metastasierten Tumor von besonderer Bedeutung. Wurden hier aus der Analyse die Patienten mit Fernmetastasen bzw. mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen ausgeschlossen, so ergab sich immer noch eine gute Auftrennung durch das angewendete LOX-Expressionsmuster, jedoch mit einem etwas schlechteren Signifikanzniveau (Log Rank Test: $p = 0.068$ bzw. $p = 0.071$). Der limitierende Faktor dieser Einteilung ist aber die geringe Fallzahl der Gruppe $LOX_a > LOX_z$ mit lediglich 9 Patienten. Die Einbeziehung der perinukleären LOX-Expression in die Einteilung des Expressionsmusters brachte keine weitere Verbesserung des prognostischen Potenzials des Parameters (Anhang 7).

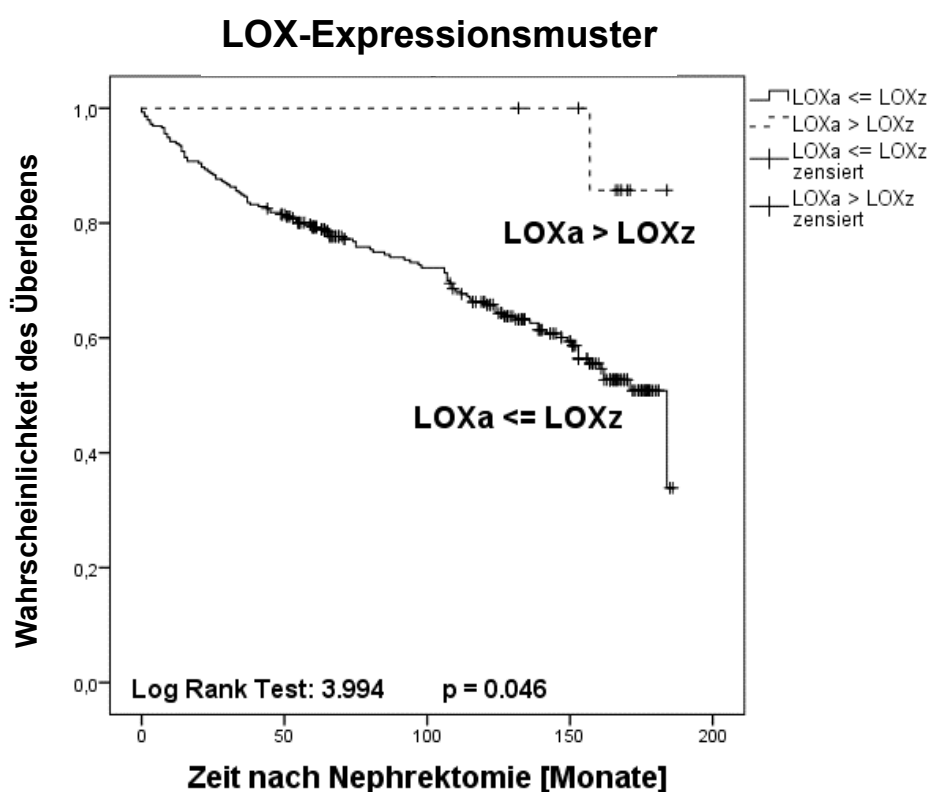


Abbildung 31. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit von ccRCC-Patienten in Abhängigkeit vom LOX-Expressionsmuster.

Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit nach Nephrektomie zur Bewertung der prognostischen Relevanz des LOX-Expressionsmusters $LOX_a \leq LOX_z$ oder $LOX_a > LOX_z$; LOX_a = apikale LOX Expression; LOX_z = zytoplasmatische LOX-Expression.

Bei dem weiteren Vergleich des LOX-Expressionsmusters mit klinisch-histologischen Daten konnte eine Assoziation mit dem Fuhrman-Grad festgestellt werden (Tabelle 13). Aufgrund der geringen Fallzahl der $\text{LOX}_a > \text{LOX}_z$ Tumore war es jedoch nicht möglich, weitere Aussagen über den Zusammenhang der LOX-Expression und klinischen bzw. pathologischen Daten zu treffen.

Tabelle 13. LOX-Expressionsmuster in ccRCC.

Eigenschaft		ccRCC Patienten (n = 301)			Fisher's Exact-Test ^a bzw. Chi-Quadrat-Test ^b
		n	$\text{LOX}_a > \text{LOX}_z$ [%]	$\text{LOX}_a \leq \text{LOX}_z$ [%]	
ccRCC		301	3	97	
Alter	< Median	160	3	97	p = 0.578 ^a
	> Median	141	3	97	
Geschlecht	weiblich	109	1	99	p = 0.103 ^a
	männlich	192	4	96	
pT-Stadium	pT1	180	5	95	p = 0.101 ^b
	pT2	14	0	100	
	pT3	105	0	100	
	pT4	2	0	100	
Grading	G1	40	10	90	p = 0.047 ^b
	G2	222	2	98	
	G3	36	3	97	
	G4	3	0	100	
Resektionsrand	R0	283	3	97	p = 0.570 ^a
	R1+R2	18	0	100	
N-Status	N0	283	3	97	p = 0.570 ^a
	N1	18	0	100	
M-Status	M0	272	3	97	p = 0.397 ^a
	M1	29	0	100	

LOX_a = apikale LOX-Expression

LOX_z = zytoplasmatische LOX-Expression

^a Fisher's Exact-Test

^b Chi-Quadrat-Test

MAP4K4-Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Anhand der MAP4K4-Färbung lässt sich eine zytoplasmatische Lokalisierung des Targets sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe erkennen. Die Intensität der Färbung wurde eingeteilt in negativ, schwach positiv, moderat positiv und stark positiv, wobei der Großteil (94 %) schwach bis moderat positiv war (Abbildung 32).

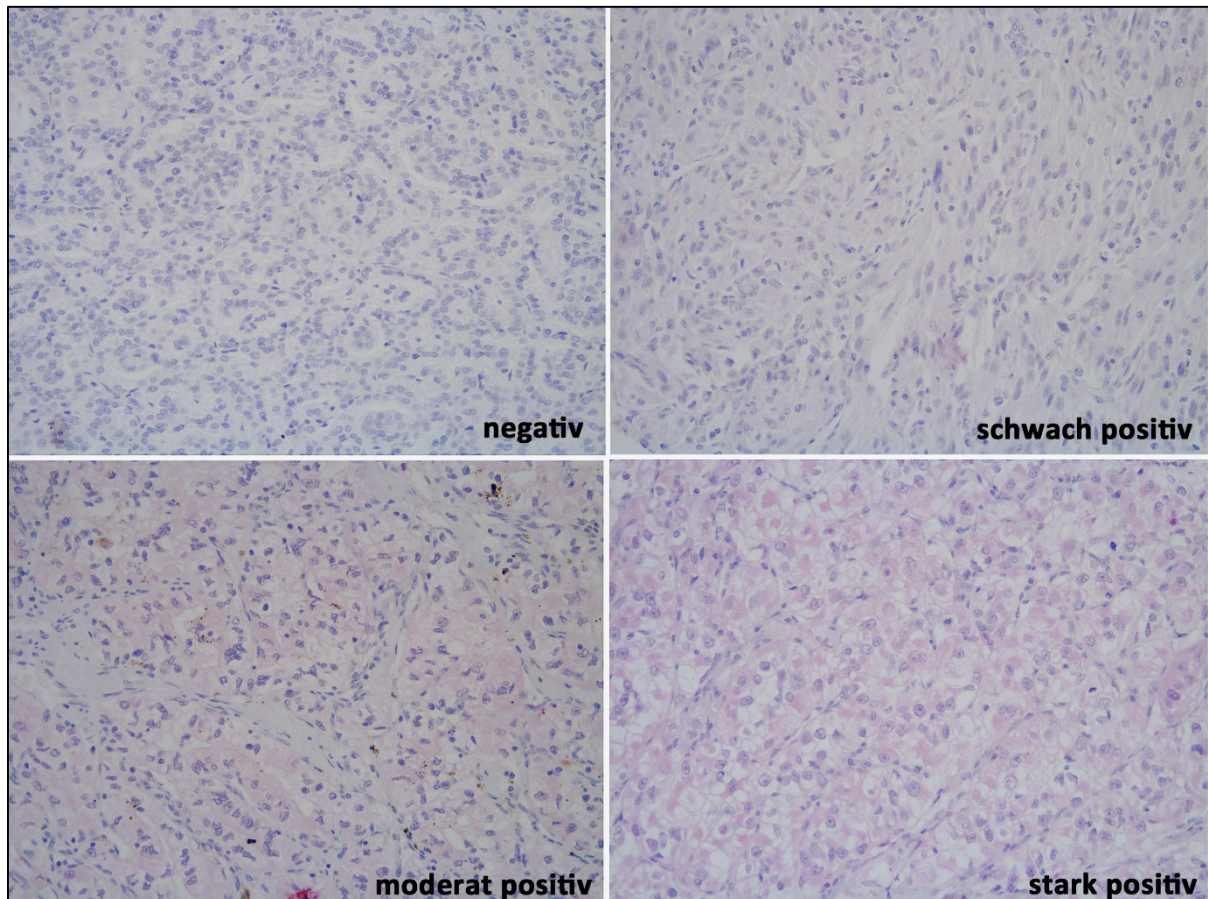


Abbildung 32. MAP4K4-Expression im Gewebe von klarzelligen Nierenzellkarzinomen.

Die Intensität der zytoplasmatischen MAP4K4-Färbung im RCC-Gewebe wurde nach folgendem Schema eingeteilt: negativ, schwach positiv, moderat positiv und stark positiv. Vergrößerung 200x.

Von den 322 ccRCC-Geweben des TMAs war die MAP4K4-Färbung von insgesamt 318 Geweben auswertbar (Tabelle 14). Da die Gruppen der negativen und stark positiven Tumore jeweils nur 10 Fälle beinhalteten und keinen Zugewinn an prognostischer Information lieferten (Anhang 8), wurden die Intensitäten zu den beiden Gruppen negativ + schwach positiv sowie moderat + stark positiv zusammengefasst (Tabelle 14).

Beim Vergleich der MAP4K4-Expression mit klinischen und histologischen Daten zeigte sich eine Assoziation mit dem Alter (Fisher's Exact-Test: $p = 0.017$), dem pT-Stadium (Chi-Quadrat-Test: $p = 0.001$), dem Grading (Chi-Quadrat-Test: $p < 0.0001$), dem Status des Resektionsrands (Fisher's Exact-Test: $p = 0.015$) sowie mit dem M-Status (Fisher's Exact-Test: $p = 0.019$) (Tabelle 14).

Tabelle 14. MAP4K4-Expression in ccRCC.

Eigenschaft		ccRCC Patienten (n = 318)			Fisher's Exact-Test ^a bzw. Chi-Quadrat-Test ^b
		n	negativ + schwach [%]	moderat + stark [%]	
ccRCC		318	55	45	
Alter	< Median	171	61	39	$p = 0.017^a$
	> Median	147	48	52	
Geschlecht	weiblich	114	60	40	$p = 0.241^a$
	männlich	204	52	48	
pT-Stadium	pT1	190	64	36	$p = 0.001^b$
	pT2	15	40	60	
	pT3	110	42	58	
	pT4	3	33	67	
Grading	G1	45	82	18	$p < 0.0001^b$
	G2	232	57	43	
	G3	38	13	87	
	G4	3	0	100	
Resektionsrand	R0	299	57	43	$p = 0.015^a$
	R1+R2	19	26	74	
N-Status	N0	300	56	44	$p = 0.465^a$
	N1	18	44	56	
M-Status	M0	288	57	43	$p = 0.019^a$
	M1	30	33	67	

^a Fisher's Exact-Test

^b Chi-Quadrat-Test

Um die prognostische Aussagekraft der MAP4K4-Expression abzuschätzen, wurde wieder eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Diese ergab eine signifikante Trennung (Log Rank Test: $p = 0.001$) der beiden nach der Intensität aufgeteilten Gruppen. Patienten mit negativer oder schwacher MAP4K4-Expression zeigten dabei eine wesentlich bessere Überlebensrate als Patienten mit moderater oder starker MAP4K4-Expression (Abbildung 33). Dieses Ergebnis konnte auch für die Patientengruppe ohne Fernmetastasen bzw. ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen (Log Rank Test: $p = 0.005$ bzw. $p = 0.008$) bestätigt werden.

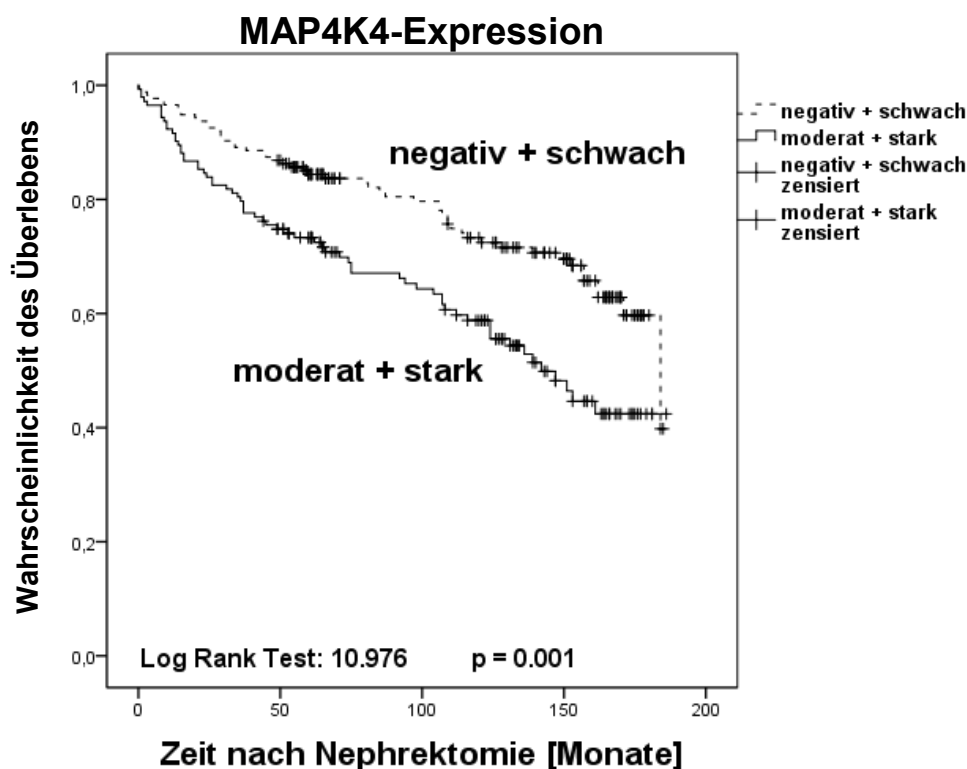


Abbildung 33. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit von ccRCC-Patienten nach Nephrektomie in Abhängigkeit von der MAP4K4-Expression.

Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit nach Nephrektomie zur Bewertung der prognostischen Relevanz der MAP4K4-Expression.

Univariate und multivariate Cox-Regressionsanalyse

Neben der Kaplan-Meier-Analyse wurden zusätzlich univariate und multivariate Cox-Regressionsanalysen als statisches Verfahren zur Abschätzung des prognostischen Potenzials der LOX- und MAP4K4-Expression angewendet (Tabelle 15). Das Auftreten von Metastasen ist der stärkste das Überleben beeinflussende Parameter. Um die Prognose für Patienten mit nicht-metastasierten ccRCC zu untersuchen, wurden Tumore mit zum Zeitpunkt der Operation diagnostizierten Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen ausgeschlossen. Dies ist auch die vom klinischen Gesichtspunkt aus eigentlich relevante Fragestellung. Einbezogen wurden in die Analyse die klinischen und pathologischen Parameter: Alter bei OP, Geschlecht, pT-Stadium, Grading und Status des Resektionsrandes. In der univariaten Analyse erwiesen sich das Alter bei OP (Cox univariat: $p < 0.0001$), pT-Stadium (Cox univariat: $p < 0.0001$), Grading (Cox univariat: $p = 0.029$) und Status des Resektionsrandes (Cox univariat: $p < 0.0001$) als prognostische Faktoren. Auch die Expression von MAP4K4 (Cox univariat: $p = 0.008$) zeigte in der univariaten Analyse ein gutes prognostisches Potenzial. Das Muster der LOX-Expression (Cox univariat: $p = 0.105$) erreichte jedoch vermutlich aufgrund der geringen Patientenzahl der $LOX_a > LOX_z$ -Gruppe keine Signifikanz. In der multivariaten Analyse, nach Einbeziehung aller zuvor signifikanter klinischen und pathologischen Parameter in das Modell, erwies sich jedoch weder MAP4K4 (Cox multivariat: $p = 0.521$) noch LOX (Cox multivariat: $p = 0.159$) als unabhängiger prognostischer Faktor in der hier untersuchten ccRCC-Patientengruppe (Tabelle 15).

Tabelle 15. Univariate und multivariate Cox-Regression für ccRCC-Patienten ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen (n = 275).

Variable	Kriterien	Univariate Analyse		Multivariate Analyse (Einschluss)			
		HR	p-Value	nur klinisch-pathologische Daten		klinisch-pathologische Daten und Targets	
				HR	p-Value	HR	p-Value
Alter bei der OP	kontinuierlich	1.053	< 0.0001	1.049	< 0.0001	1.048 ^a 1.050 ^b	$< 0.0001^a$ $< 0.0001^b$
Geschlecht	weiblich männlich	0.747	0.202				
pT-Stadium	pT1-2 pT3-4	2.398	< 0.0001	2.009	0.003	2.029 ^a 1.687 ^b	0.003 ^a 0.040 ^b
Grading	G1-2 G3-4	1.934	0.029	1.610	0.144	1.475 ^a 1.770 ^b	0.259 ^a 0.080 ^b
Resektionsrand	R0 R1-2	7.937	< 0.0001	3.713	0.006	3.585 ^a 4.886 ^b	0.007 ^a 0.001 ^b
MAP4K4	negativ + schwach moderat + stark	1.788	0.008			1.173 ^a	0.521 ^a
LOX	$LOX_a > LOX_z$ $LOX_a \leq LOX_z$	0.195	0.105			0.239 ^b	0.159 ^b

HR = Hazard Ratio

^a Analyse des Modells mit klinisch-pathologische Daten und MAP4K4

^b Analyse des Modells mit klinisch-pathologische Daten und LOX

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass MAP4K4 eng mit klinisch-pathologischen Kenngrößen assoziiert ist, in der univariaten Auswertung (Kaplan-Meier-Analyse; Cox-Regression) ein Indikator für das Gesamtüberleben ist, sich jedoch in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben erweist. LOX als der zweite näher evaluierte mögliche prognostische Marker war hingegen weniger aussagekräftig hinsichtlich der Vorhersage des klinischen Endpunktes Gesamtüberleben.

4. Diskussion

Die Entstehung und Progression von Tumoren wird durch eine Vielzahl molekularer Veränderungen in tumorrelevanten Signalwegen vorangetrieben (Hanahan et al. 2000). Während Veränderungen in Signalwegen der Proliferation vorwiegend das Wachstum des Primärtumors beeinflussen, stehen Abweichungen in der Regulation der Migration und Invasion im Zusammenhang mit der Metastasierung von Tumoren (Hanahan et al. 2011). Auch wenn mittlerweile eine Reihe von zielgerichteten Therapieansätzen entwickelt werden konnten, sind die therapeutischen Möglichkeiten vor allem aufgrund von Resistenzen vieler Tumore leider noch sehr begrenzt (Ljungberg et al. 2015). Daher ist es enorm wichtig, die ablaufenden molekularen Prozesse bei der Tumorgenese des Nierenzellkarzinoms genauer zu untersuchen und zu verstehen, um mögliche neue diagnostische und prognostische Marker zu etablieren oder neue Therapiestrategien zu entwickeln.

Wie in der Einleitung bereits aufgeführt, weist das klarzellige Nierenzellkarzinom einige sehr charakteristische Veränderungen im Expressionsprofil von spezifischen Genen und miRNAs sowie Abweichungen des epigenetischen Musters auf (Jung et al. 2009; Sato et al. 2013). Die Entstehung und Progression des Nierenzellkarzinoms ist dabei ein sehr komplexer Prozess, an dem viele Komponenten und Mechanismen beteiligt sind. Dies gilt insbesondere auch für miRNAs, die in ihrer Funktion als posttranskriptionelle Regulatoren von zentraler Bedeutung für die Genexpression sind. Daher richtete sich der Fokus dieser Arbeit auf deren Regulation und spezifische Funktionen beim klarzelligen Nierenzellkarzinom. Hierbei konnte beispielhaft gezeigt werden, wie epigenetische Modifikationen auch an der Regulation von miRNAs beteiligt sind und welche miRNAs beim Nierenzellkarzinom davon betroffen sind. Zudem wurden die Nachweise für die funktionelle Bedeutung der epigenetisch regulierten miR-141 und miR-145 als Einzelkomponenten und in Kombination mit ihrer teilweise synergistischen tumorsuppressiven Wirkung bei proliferativen, migratorischen und invasiven Prozessen erbracht sowie deren Targets LOX und MAP4K4 identifiziert.

Im Folgenden werden einzelne Punkte diskutiert, die sich aus den Ergebnissen der experimentellen Untersuchungen ergeben haben. Die Ausführungen werden dabei nicht nur das Nierenzellkarzinom betreffen, sondern auch allgemeine Aspekte der Kanzerogenese und Tumorprogression berücksichtigen.

4.1. Analytisch bedingte Verzerrungen von miRNA-Profilen

Aufgrund der verbreiteten Dysregulation von miRNAs in Tumoren bieten spezifische miRNA-Expressionsprofile eine vielversprechende Basis zur Identifikation neuer Biomarker zur Verbesserung von Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle der Erkrankung an. So wurden bereits erhebliche Anstrengungen unternommen, um tumorspezifische Expressionsmuster auch bei urologischen Tumoren zu identifizieren und deren Potenzial als Biomarker zu prüfen (Patil et al. 2015; Schaefer et al. 2010b; Tolle et al. 2014). Ein Großteil dieser Studien liefert jedoch unterschiedliche bzw. sogar widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Expression von einzelnen miRNAs (Schaefer et al. 2010b). Die fehlende Vergleichbarkeit von einzelnen Studien verhindert daher auch die Erkennung geeigneter miRNAs und somit deren Einsatz als Biomarker. Ursachen für diese fehlende Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit sind u. a. in Anwendungen nicht harmonisierter, geschweige denn standardisierter präanalytischer und analytischer Prozesse zu suchen (McDonald et al. 2011; Ralla et al. 2014).

Es ist seit langem bekannt, dass die Qualität der isolierten RNA wesentlich die Zuverlässigkeit der gewonnenen Expressionsdaten beeinflusst. Aus diesem Grund wurde 2006 der RNA-Integritäts-Index eingeführt (Schroeder et al. 2006). Dieser Index charakterisiert mit Werten zwischen 1 bis 10 die Intaktheit der isolierten RNA nach automatisierter kapillarelektrophoretischer Auftrennung, basierend auf der Lab-on-Chip-Technologie (Schroeder et al. 2006). Gesamt-RNA-Proben mit Werten unter 5 weisen auf erhebliche Degradation der RNA hin und werden zumindest für mRNA-Analysen als nicht mehr geeignet angesehen (Fleige et al. 2006). Anders ist die Situation bei miRNAs, deren Expressionswerte weniger von der Degradation der RNA abhängig sind (Jung et al. 2010). Wenig Beachtung fanden bisher hingegen mögliche Verzerrungen von Expressionsprofilen, wenn unterschiedliche RNA-Isolierungsverfahren eingesetzt wurden (Redshaw et al. 2013). Wie bereits erwähnt zeigten sich zufällig im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen Unstimmigkeiten bezüglich der Expression einzelner miRNAs beim Einsatz anderer Isolierungstechniken. Dieser Problematik wurde daher im Rahmen dieser Doktorarbeit durch systematische Untersuchungen nachzugehen.

Die im Abschnitt 3.1 dargestellten Ergebnisse belegen, dass die Art der Isolierung von Gesamt-RNA nicht nur einen enormen Einfluss auf die RNA-Ausbeute, sondern auch auf die Zusammensetzung der RNA-Proben im small-RNA-Bereich und damit auf das erstellte miRNA-Expressionsprofil hat. Von großer Bedeutung für die miRNA-Detektion ist der niedermolekulare small-RNA-Bereich, in dem sich auch die miRNAs befinden. Die verwendete Isolierungsmethode muss gewährleisten, dass auch die in diesem Bereich zu findenden „kurzen“ RNAs, wie es die miRNAs sind, quantitativ isoliert werden. Dass dies offensichtlich bei den fünf untersuchten Techniken nicht der Fall ist, lässt sich aus den Abbildungen (Abbildung 10, S. 35; Abbildung 12, S. 36) unschwer erkennen. Die Expressionen für die beispielhaft untersuchten miRNAs variierten erheblich und waren zudem von Gewebe zu

Gewebe unterschiedlich. Da sich einzelne miRNAs und auch die sonst häufig für Vergleichszwecke herangezogenen RNUs hier sehr unterschiedlich verhielten, war es nicht möglich, diesen Effekt durch Normalisierung auszugleichen. Die Normalisierung führte z. T. sogar noch zu einer stärkeren Verzerrung der miRNA-Expressionsdaten (Abbildung 11, S. 36; Abbildung 13, S. 37). In Modelluntersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese selektiven Isolierungseffekte u. a. abhängig vom GC-Gehalt und der sekundären Struktur der jeweiligen miRNAs sind (Accerbi et al. 2010; Kim et al. 2012). So könnte das spezifische Verhalten von miRNAs auch die abweichenden Ergebnisse einzelner Studien erklären, die unter Zuhilfenahme verschiedener Plattformen erhoben wurden (Watson et al. 2012).

Für die Untersuchungen zur eigentlichen Thematik der epigenetischen Beeinflussung von miRNAs wurde ausschließlich die Qiagen-Methode genutzt, die sich gegenüber den anderen Isolierungstechniken als vorteilhaft erwiesen hatte. Daher konnten entsprechende Fehler ausgeschlossen werden. Um die Problematik der Normalisierung zu lösen, wurden die verwendeten Referenzgene in dem jeweiligen untersuchten Modell auf deren Stabilität überprüft. Für die Normalisierung der Zellkulturversuche wurden die oben beschriebenen RNU6B und RNU48 verwendet. Bei diesen Untersuchungen handelte es sich Größtenteils um Vorher-Nachher-Versuche, wodurch die entsprechenden Vergleichsmöglichkeiten gegeben waren. Zudem konnten wir nachweisen, dass die jeweilige Behandlung keine Auswirkungen auf die Expression dieser beiden RNUs hatte und somit entsprechende Fehler ausgeschlossen werden konnten. Für die Expressionsanalysen im Gewebe wurden die durch meine Kollegin Frau Wotschofsky validierten Referenz-miRNAs miR-28, miR-103 und miR-106a genutzt. Sie konnte zeigen, dass diese stabil über normales Nierengewebe und ccRCC-Gewebe hinweg exprimiert werden und daher hier für die Normalisierung von miRNA-Expressionsdaten geeignet waren (Wotschofsky et al. 2011).

Zusammenfassend muss aus diesen methodisch orientierten Untersuchungen jedoch geschlussfolgert werden, dass analytisch-bedingte Verzerrungen eine bedeutende Einflussgröße bei der Erstellung von miRNA-Expressionsprofilen darstellen. Daher müssen methodische Unterschiede beim Vergleich und bei der Planung, insbesondere bei multizentrischen Studien, berücksichtigt werden. Für die Validierung und Etablierung von zuverlässigen Biomarkern sind somit eine Harmonisierung/Standardisierung von präanalytischen und analytischen Prozessen und serien- sowie studienübergreifende Kontrollen dringend erforderlich. Im Rahmen der groß angelegten SPIDIA-Studien werden bereits große Anstrengungen unternommen um durch die Entwicklung und Validierung von nötigen Richtlinien zur Standardisierung und Verbesserung von präanalytischen Prozessen der *in-vitro*-Diagnostik beizutragen und so eine bessere Vergleichbarkeit, Reproduzierbarkeit und Rückführbarkeit von Daten zu ermöglichen (Malentacchi et al. 2014; Pazzagli et al. 2013).

4.2. Epigenetische Regulation von microRNAs

Globale Hypomethylierung mit lokaler Hypermethylierung sowie Abweichungen von Histonmodifikationen sind die häufigsten mit Tumoren assoziierten epigenetischen Veränderungen (Esteller 2007). Aberrationen des epigenetischen Musters sind auch in urologischen Tumoren wie beim klarzelligen Nierenzellkarzinom zu finden (Geybels et al. 2015; Harb-de la Rosa et al. 2015a; Harb-de la Rosa et al. 2015b). Dabei ist die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch DNA-Hypermethylierung ein weit verbreiteter und mittlerweile vielfach untersuchter Prozess. Auch für das Nierenzellkarzinom konnte dieser Mechanismus bereits als Ursache für zahlreiche stillgelegte tumorsuppressive Gene nachgewiesen werden (Morris et al. 2010).

Wie ich in einem Übersichtsartikel anhand von Daten urologischer Tumore zusammengestellt habe, besteht auch ein enges Zusammenspiel zwischen epigenetischen Mechanismen und miRNAs (Liep et al. 2012). So sind miRNAs auf der einen Seite durch posttranskriptionelle Regulation an der Kontrolle von Komponenten der epigenetischen Maschinerie beteiligt, auf der anderen Seite kann die Transkription von miRNAs durch epigenetische Mechanismen gesteuert werden, wobei auch hier die Inaktivierung von tumorsuppressiven miRNAs durch DNA-Hypermethylierung eine sehr wichtige Rolle spielt (Liep et al. 2012). Durch die Forschungsabteilung der Klinik für Urologie der Charité wurde ein miRNA-Profil des ccRCCs durch Mikroarray-Analyse und RT-qPCR-Validierung erstellt und zahlreiche differenziell exprimierte miRNAs ermittelt (Jung et al. 2009). Wie in diesem Profiling gezeigt werden konnte, liegt ein Großteil der dysregulierten miRNAs im malignen Gewebe reduziert vor. Vorherige Daten legten nahe, dass auch hier epigenetische Mechanismen beteiligt sein könnten. Dies war der Ausgangspunkt für weitere experimentelle Untersuchungen, die zusammen mit Frau Dr. Wotschofsky in geteilter Erstautorenschaft bereits publiziert wurden (Wotschofsky, Liep et al. 2012) und die in der vorliegenden Arbeit ausführlich dargestellt sind.

Durch den Einsatz von Inhibitoren ist es möglich, die Beteiligung von epigenetischen Mechanismen an der Stilllegung bestimmter Gene zu überprüfen (Ge et al. 2015). Daher wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein *in-vitro*-Demethylierungsversuch an Nierentumorzellen durchgeführt, um entsprechend epigenetisch stillgelegte miRNAs zu identifizieren. Mithilfe von Bisulfitssequenzierungen konnte nachgewiesen werden, dass die hier angewendete Demethylierung eine Reduktion der Methylierung in bestimmten Bereichen um über 50 % bewirken konnte (Abbildung 18, S. 45).

Im Abschnitt 3.2 wurde dargestellt, dass durch demethylierende Behandlung die als reduziert gefundenen miR-127, miR-141 und miR-145 in mindestens zwei der vier untersuchten Zelllinien re-exprimiert wurden (Abbildung 15, S. 42; Tabelle 9, S. 41). Die Expression dieser drei miRNAs ist im Normalfall in den Zelllinien insgesamt stark gehemmt, wobei der Effekt der Re-expression bei den Zelllinien mit der geringsten Grundexpression der jeweiligen miRNA am stärksten ausfiel. In diesen Zelllinien scheint die epigenetische Inhibierung am stärksten ausgeprägt zu sein. Eine erhöhte Expression der jeweiligen miRNA wurde dabei bereits allein

durch die Behandlung mit dem Demethylierungs-Reagenz Aza bewirkt. Daher scheint es sich hierbei um den entscheidenden Mechanismus bei der Stilllegung der untersuchten miRNAs zu handeln. Durch die Kombination von Aza und TSA konnte ein noch stärkerer Effekt erzielt werden. Dies spricht für eine zusätzliche Rolle der Histon-Acetylierung bei der miRNA-Hemmung. Anhand von Bisulfitsequenzierungen konnte zudem gezeigt werden, dass die untersuchten CpG-reichen Regionen von Promotorbereichen der miR-127, miR-141 und miR-145 in der Zelllinie 786-O vor demethylierender Behandlung in einem sehr stark methylierten Zustand vorlagen (Abbildung 18, S. 45). Dies entspricht den oben beschriebenen Befunden der Demethylierungsversuche.

Die miR-127 ist von den drei im Detail genauer untersuchten miRNAs diejenige mit den größten vorhergesagten CpG-Inselbereichen rund um den Transkriptionsstart. Für diese miRNA wurde bereits eine durch DNA-Methylierung vermittelte reduzierte Expression in Karzinomen der Harnblase (Saito et al. 2006b), Lunge (Tan et al. 2015), Leber (Yang et al. 2013) und des Magens (Guo et al. 2013; Tsai et al. 2011) beschrieben. Dabei wurde in Tumorzelllinien des Magens und der Leber ebenfalls gezeigt, dass vorwiegend die DNA-Methylierung und weniger die Histonmodifikationen für die Hemmung verantwortlich sind (Tsai et al. 2011). Zur epigenetischen Regulation der Expression der miR-127 im Nierenzellkarzinom war bisher jedoch noch nichts bekannt und konnte hier somit zum ersten Mal gezeigt werden.

Die miR-141 und miR-200c sind in einem gemeinsamen Cluster angeordnet und gehören zur miR-200-Familie, die in eine Reihe von EMT-Prozessen involviert ist. Dieses miR-200c/141-Cluster ist eng mit CpG-Inseln und CpG-reichen Regionen assoziiert. Die Methylierung dieser Bereiche spielt eine wichtige Rolle bei der normalen zelltypspezifischen Expression dieser miRNAs (Vrba et al. 2010). Abweichende DNA-Methylierungsmuster im Bereich des miR-200c/141-Clusters sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie auch mit Tumoren assoziiert (Tang et al. 2013; Vrba et al. 2010). Dies betrifft Karzinome des Magens (Zhou et al. 2015), Kolons (Hur et al. 2013), der Brust (Neves et al. 2010) sowie kutane Lymphome (Sandoval et al. 2015). Der Methylierungsstatus von miR-141 in humanen Nierenkarzinomzellen wurde bislang noch nicht beschrieben. In Versuchen mit Hundenierenzellen wurde jedoch gefunden, dass durch die Induktion von EMT, mittels spezifischer Transkriptionsfaktoren die Methylierung der Gene der miR-200-Familie ansteigt und deren Expression entsprechend abnimmt (Diaz-Martin et al. 2014; Gregory et al. 2011).

Auch die dritte hier untersuchte miRNA, miR-145, wurde bereits im Zusammenhang mit Hypermethylierung in Tumoren beschrieben. So ist die Hypermethylierung des Promotorbereichs der miR-145 mit einem aggressiven Phänotypen des Lungenkarzinoms und dessen Metastasierung verbunden (Donzelli et al. 2015; Ye et al. 2015). Aber auch andere Tumore wie das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, das Gliom und das Prostatakarzinom weisen eine hohe Methylierung und eine damit verbundene geringe Expression der miR-145 auf (Harada et al. 2015; Rani et al. 2013; Suh et al. 2011). Im Prostatakarzinom wurde ein negativer Feedback-Loop zwischen miR-145 und der DNA-Methylierung beschrieben (Xue et

al. 2015). Dabei ist die durch Methylierung regulierte miR-145 in der Lage, die für die DNA-Methylierung verantwortliche DNA-Methyltransferase DNMT3b zu hemmen. Dieser Mechanismus scheint auch eine Rolle bei der Strahlungssensitivität des Tumors zu spielen, wobei entweder eine Überexpression von miR-145 oder eine Hemmung von DNMT3b zu einer höheren Sensitivität von Tumorzellen führte (Xue et al. 2015). Seit Publikation unserer Daten gibt es mittlerweile auch Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen, die die hier beschriebenen Ergebnisse der epigenetischen Regulation von miR-145 in Nierenzellkarzinomzelllinien bestätigen (Doberstein et al. 2013). Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurden dabei RCC-Zellen mit demethylierenden Substanzen behandelt, wobei sich ebenfalls eine Re-expression der miR-145 zeigte.

Die epigenetische Regulation der Expression durch Methylierung von mit Promotoren assoziierten CpG-Inseln ist inzwischen gut erforscht. Im direkten Bereich des Transkriptionsstarts der miR-141 und miR-145 befinden sich jedoch keine CpG-Inseln, die den angewendeten Suchkriterien des Programms MethPrimer zur Prädiktion von CpG-Inseln entsprechen. Die Sequenzen weisen allerdings CpG-reiche Regionen auf, die, wie in den Versuchen hier gezeigt werden konnte, stark methyliert vorlagen. Inzwischen zeigen auch Daten von anderen Arbeitsgruppen, dass nicht nur Promotoren, die CpG-Inseln enthalten, durch DNA-Methylierung reguliert werden können, sondern dass auch der Methylierungsstatus von CpG-Stellen in nicht-CpG-Inseln von großer Bedeutung ist und zur epigenetischen Stilllegung von Genen führen kann (Han et al. 2011a; Marx et al. 2013). Die miR-141 zeigte zudem vor dem Transkriptionsstartpunkt im Abstand von über 500 bp eine CpG-Insel, die in 786-O-Zellen sehr stark methyliert war. Solche weiter entfernten CpG-Inseln oder sogenannte CpG-Insel-Shores werden auch als wichtige regulatorische Bereiche angesehen, deren Methylierungsstatus eng mit der gewebe- oder tumorspezifischen Expression von Genen verbunden ist (Irizarry et al. 2009).

Dem Methylierungsstatus einiger miRNA-Gene kommt somit offensichtlich eine bedeutende Rolle bei deren Stilllegung im Nierenzellkarzinom zu. Da epigenetische Modifikationen potenziell reversibel sind, gelten sie als ein vielversprechender Ansatzpunkt für neue Therapien. Während Untersuchungen bei hämatologischen Erkrankungen schon vielversprechende Ergebnisse zeigen, waren klinische Studien in soliden Tumoren bislang weniger erfolgreich (Ye et al. 2015). Aufgrund der geringen Spezifität der Inhibitoren und der damit verbundenen Nebenwirkungen und Toxizität konnten sie bisher nicht in der Therapie eingesetzt werden. Auch wenn sich hier diverse Probleme aufzeigen, besteht immer noch ein Entwicklungspotenzial in Richtung epigenetischer Tumorthherapie mit einer neuen Klasse von Substanzen. Es ist daher enorm wichtig zu untersuchen, in welche Prozesse diese Substanzen genau eingreifen, wie sie mit miRNAs in Wechselwirkung stehen, wie dadurch die miRNA-Expression beeinflusst wird und welche Bedeutung dieser Effekt für die therapeutische Wirksamkeit haben könnte (Davalos et al. 2010).

4.3. Funktionelle Bedeutung von miR-141 und miR-145 im RCC

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Funktion der epigenetisch regulierten miR-141 und miR-145 sowie deren Bedeutung für die Tumorgenese des Nierenzellkarzinoms genauer untersucht. Dabei konnte für beide miRNAs eine klare tumorsuppressive Wirkung durch Hemmung von Proliferation (nur miR-141), Migration oder Invasion von Nierentumorzellen sowie ein regulativer Effekt auf eine Reihe von tumorassoziierten onkogenen Targets gezeigt werden.

4.3.1. Expression der miR-141 und miR-145

Die Gene der beiden miRNAs sind jeweils in einem bicistronischen Cluster miR-200c/141 bzw. miR-143/145 angeordnet. Die Expressionen der assoziierten miRNAs sind aufgrund der Sekundär- und Tertiärstruktur des primären Transkripts sowie durch andere Regulationsmechanismen jedoch nicht immer direkt korreliert (Chaulk et al. 2011). Die Expression von miRNAs und deren Funktion ist stark gewebespezifisch. So können miRNAs in verschiedenen Geweben sowohl unterschiedliche Expression als auch Wirkungen haben.

Da miR-145 bzw. das miR-143/145-Cluster in den bislang untersuchten Tumoren grundsätzlich im Vergleich zum Normalgewebe verringert vorliegt, scheint miR-145 ausschließlich als Tumorsuppressor zu fungieren. Eine erniedrigte miR-145-Expression wurde in Karzinomen der Harnblase (Ratert et al. 2013), der Prostata (Schaefer et al. 2010a), der Ovarien (Gadducci et al. 2014), der Lunge (Shen et al. 2015), der Brust (Min et al. 2014), des Ösophagus (Gu et al. 2013), des Kolons (Michael et al. 2003) und inzwischen nach unserer Veröffentlichung (Wotschofsky, Liep et al. 2012) auch für die Niere von anderen Arbeitsgruppen (Doberstein et al. 2013; Lu et al. 2014; Yoshino et al. 2013a) beschrieben. Beim Nierenzellkarzinom war eine geringe miR-145-Expression signifikant mit einem verkürzten rezidivfreien Intervall von Patienten nach Tumornephrektomie korreliert (Slaby et al. 2012). In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten ccRCC-Patientenkollektiv war die Expression in malignem Gewebe um etwa 1/3 geringer als im angrenzenden Normalgewebe. Bei der Auftrennung der Tumore in primär metastasierte (M1) bzw. nicht-metastasierte (M0) Tumore zeigte sich jedoch, dass lediglich M0-Tumore eine verringerte miR-145-Expression aufwiesen und dies bei M1-Tumoren nicht mehr beobachtet wurde. Dies ist jedoch vermutlich der untersuchten Kohorte und deren geringen Größe geschuldet. So dass die in der M1-Gruppe vorhandenen wenigen Patienten mit einer inversen miR-145-Expression die Ergebnisse stark beeinflussen konnten. In Knochenmetastasen von ccRCC-Patienten wurde eine stärkere Herunterregulation der miR-145 im Metastasengewebe als im Primärtumor gefunden (Wotschofsky, Liep et al. 2012). Wie sich der Übergang der miR-145-Expression im Nierennormalgewebe hin zur aberranten Expression im nicht-metastasierten Primärtumor, im metastasierten Primärtumor und in Fernmetastasen verhält, ist somit noch nicht endgültig geklärt.

Die Rolle der miR-141 in der Karzinogenese und Tumorprogression ist nicht so eindeutig wie die der miR-145. miR-141 gehört zur miR-200-Familie, die sich aus den miRNAs der beiden

Cluster miR-200b/a/429 und miR-200c/141 zusammensetzt. Es wurden erhöhte und auch erniedrigte Expressionen von miR-141 in Tumoren gefunden. In Karzinomen der Prostata (Schaefer et al. 2010a; Waltering et al. 2011), der Harnblase (Han et al. 2011b), der Ovarien (Gadducci et al. 2014) und der Lunge (Tejero et al. 2014) war die Expression erhöht, in denen der Brust (Luo et al. 2013; Xu et al. 2015a), des Magens (Chang et al. 2015) und auch der Niere (Nakada et al. 2008; Wotschofsky, Liep et al. 2012) war sie vermindert. Mitglieder der miR-200-Familie sind beim Nierenzellkarzinom die am häufigsten herunterregulierten miRNAs (Yoshino et al. 2013b). Durch eine Metaanalyse von 29 Studien wurde die verringerte Expression der miR-141 sowie der miR-200c und miR-429 als robuste Biomarkersignatur zur Unterscheidung von Tumorgewebe von normalem Nierengewebe identifiziert. Dabei war das Ausmaß der verringerten Expression von miR-141 mit einem verkürzten tumorspezifischen Überleben der Patienten assoziiert (Silva-Santos et al. 2013; Tang et al. 2015). Zudem wurde auch im Serum von RCC-Patienten im Vergleich zu Patienten mit benignen Nierenläsionen eine verminderte Konzentration von miR-141 bestimmt (Cheng et al. 2013). Auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv wurde eine stark verringerte miR-141-Expression in allen Patienten nachgewiesen (Abbildung 25, S. 56). Daraus ergab sich die sehr gute Diskriminationseigenschaft von miR-141, um zwischen Normal- und Tumorgewebe mit einem hohen AUC-Wert von 0.921 zu unterscheiden (Tabelle 11, S. 60). Wie zuvor schon beschrieben, ist die Unterscheidung zwischen Primär-M0- und Primär-M1-Tumoren mithilfe der miR-141 jedoch nicht möglich (Wotschofsky et al. 2013). Auch wenn die miR-200-Familie vorwiegend mit Prozessen von EMT in Zusammenhang gebracht werden (Zaravinos 2015), scheint der Verlust der miR-141 ein frühes Ereignis im ccRCC zu sein. Da aber auch eine Beziehung zwischen miR-141-Expression mit dem Patientenüberleben zu bestehen scheint, besteht vermutlich durchaus auch eine Rolle bei späteren, die Metastasierung betreffenden Prozessen.

4.3.2. Funktion der miR-141 und miR-145

Die verbreitete Dysregulation der Expression von miR-141 und miR-145 über diverse unterschiedliche Tumorentitäten hinweg und speziell im Nierenzellkarzinom deutet auf eine entscheidende Rolle dieser miRNAs bei tumorrelevanten Signalwegen hin. Zu Beginn dieser Doktorarbeit war noch nicht viel über die genaue Bedeutung einzelner miRNAs bekannt. In den letzten zwei bis drei Jahren konnten jedoch viele neue Erkenntnisse über die Funktion der miRNAs im Allgemeinen bzw. der miR-141 und miR-145 im Speziellen erlangt werden.

Funktion der miR-145

Für die miR-145 war bisher vorwiegend eine Funktion beim Tumorwachstum durch die Regulation der Zellproliferation und die Induktion von Zelltod durch apoptotische oder nicht-apoptotische Mechanismen bekannt (Ostenfeld et al. 2010). Zu den bisher aus anderen Tumoren bekannten Apoptose-assoziierten Targets von miR-145 gehören TRIM2 (Chen et al. 2015), NAIP (Xu et al. 2015b), c-MYC (Sachdeva et al. 2009), CBFB, PPP3CA, und CLINT1

(Ostenfeld et al. 2010). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an Nierentumorzelllinien konnten mit BIRC2, VRK2, EAPP, TNFRSF10B und TGFB2 weitere anti-apoptotische bzw. proliferationsfördernde Targets von miR-145 identifiziert werden (Abbildung 23, S. 53; Abbildung 24, S. 54). Bei BIRC2 handelt es sich dabei um einen in vielen Tumoren überexprimierten Apoptose-Inhibitor, dessen prognostisches Potenzial für das Nierenzellkarzinom bereits diskutiert, jedoch noch nicht eindeutig geklärt wurde (Crispen et al. 2008; Kempkensteffen et al. 2007; Lau et al. 2012). Ein regulatorischer Zusammenhang zwischen BIRC2 und miR-145 wurde bisher lediglich in Kolonkarzinomzellen nachgewiesen (Gregersen et al. 2010). Zur Rolle des Targets VRK2 im RCC, das ebenfalls in der Lage ist, Apoptose zu reduzieren (Monsalve et al. 2013), oder zur dessen Regulation durch miRNAs, ist jedoch bisher noch nichts bekannt. EAPP stimuliert über eine E2F-abhängige Transkription die Zellproliferation (Novy et al. 2005). Es gibt bisher jedoch noch keine Daten zur Expression von EAPP im Nierenzellkarzinom oder dessen Regulation durch miRNAs.

Ein weiteres, hier zum ersten Mal als Target von miR-145 beschriebenes Gen ist der TRAIL-Rezeptor TNFRSF10B. Ursprünglich galt der Signalweg des Liganden TRAIL und dessen Rezeptoren als Auslöser für immuninduzierte Apoptose bei der tumorassoziierten Immunantwort (Bellail et al. 2009). Es kann jedoch je nach zellulärer Lokalisation des Rezeptors TNFRSF10B auch zu einem anti-apoptotischen Signal kommen, wobei eine Reihe von Tumoren erhöhte intrazelluläre TNFRSF10B-Werte aufweisen (Bertsch et al. 2014). Außerdem kann miR-145 auch ein weiteres Target in diesem Signalweg, den Liganden TNFSF10B, hemmen (Zaman et al. 2010). Eine große Studie an über 800 Nierentumoren ergab zudem, dass hohe Expressionswerte von TNFRSF10B und dessen Liganden TRAIL mit einer schlechten Prognose des tumorspezifischen Patientenüberlebens assoziiert sind (Macher-Goeppinger et al. 2009). Für den *transforming growth factor beta* TGFB2 konnte hier erstmals eine leichte Regulation durch die miR-145 gezeigt werden.

Durch die Hemmung dieser Targets hat die miR-145 somit eine Vielzahl an Möglichkeiten die Apoptose zu fördern. Zudem ist bekannt, dass die Expression von miR-145 sowohl durch den Transkriptionsfaktor p53 als auch durch HIF induziert werden kann (Blick et al. 2015; Sachdeva et al. 2009). Somit kann die Expression von miR-145 durch die Hemmung anti-apoptotischer Targets die p53- bzw. die Hypoxie-vermittelte Apoptose induzieren. Durch die hypermethylierungsbedingte Blockierung der miR-145 im Nierenzellkarzinom könnte dieser Signalweg unterbrochen und die p53- bzw. Hypoxie-vermittelte Apoptose gehemmt werden. Die Apoptose-induzierende und proliferationshemmende Wirkung der miR-145 wurde zwar mittlerweile auch für Nierenkarzinomzellen beschrieben (Lu et al. 2014; Yoshino et al. 2013a), eine Reduktion der Proliferation durch Überexpression der miR-145 konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit trotz mehrerer separater Versuchen nicht bestätigt werden. Dies ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass unterschiedliche Versuchsbedingungen gewählt und z. T. synthetische miRNAs von anderen Herstellern bezogen wurden.

Zusätzlich zu der Rolle von miR-145 als Wachstumsregulator konnte aber auch eine Beteiligung an migratorischen und invasiven Mechanismen in unterschiedlichen Tumoren

gezeigt werden (Kano et al. 2010; Lu et al. 2014). Als migrations- und invasionsfördernde Targets der miR-145 konnten bislang unter anderem FSCN1 (Kano et al. 2010), ABCG2 (Shi et al. 2014), MUC1 (Ye et al. 2015) und SOX2 (Ozen et al. 2015) identifiziert werden. Wie in dieser Arbeit hier gezeigt wurde, ist es durch Überexpression der miR-145 in Nierentumorzellen möglich, deren Migration und Invasion zu hemmen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus anderen Studien überein (Lu et al. 2014; Yoshino et al. 2013a). Zu den migrations- oder invasionsinduzierenden Targets, die in Nierentumorzellen bereits gefunden wurden, zählen ANGPT2 (Lu et al. 2014), NEDD9 (Lu et al. 2014), Oct-4 (Bussolati et al. 2012) und ADAM17 (Doberstein et al. 2013).

In der Arbeit hier konnten weitere bei diesen Prozessen beteiligte Targets identifiziert werden, die offensichtlich einer miR-145-vermittelten Regulation in Nierenzellkarzinomzellen unterliegen. Hierzu gehören die pro-migratorischen HS6ST2, LOX und MAP4K4 sowie der mesenchymale Marker CDH2 (N-cadherin), die Angiogenese-Regulatoren NRP2 und SERPINE1 und der Toll-like Rezeptor TLR4. Der regulatorische Zusammenhang zwischen miR-145 und NRP2 wurde hier erstmals beschrieben. Bei NRP2 handelt es sich um einen VEGF-Corezeptor, der im Nierenzellkarzinom hoch reguliert ist und mit dem Gesamtüberleben von Patienten und dem Auftreten von Metastasen korreliert (Cao et al. 2013). Eine erhöhte Expression des pro-angiogenetischen Faktors SERPINE1 ist bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen mit einer erhöhten Mikrogefäßdichte und ebenfalls einer schlechten Prognose für das Gesamtüberleben assoziiert (Zubac et al. 2010). Erste Hinweise zu einer Regulation von SERPINE1 durch miR-145 wurden bei Versuchen an Blasenkarzinomzellen gezeigt (Villadsen et al. 2012), sind aber beim Nierenzellkarzinom bisher nicht bestätigt. Über die Rolle des mesenchymalen Markers N-Cadherin bei der Metastasierung des Nierenzellkarzinoms ist bisher noch nicht viel bekannt. In anderen Tumoren konnte jedoch gezeigt werden, dass N-Cadherin die Motilität und Invasivität von Zellen fördert (Shih et al. 2012). Zudem wurde eine direkte Regulation von N-Cadherin durch miR-145 im Magenkarzinom nachgewiesen, wobei eine durch die miR-145-vermittelte Hemmung von N-Cadherin eine verminderte Migration von Tumorzellen beobachtet werden konnte (Gao et al. 2013). Auch der Toll-like Rezeptor TLR4 liegt in einigen Tumoren dysreguliert vor und ist vermutlich an Prozessen der Tumor-Immunevasion beteiligt (Fu et al. 2013). Er wird jedoch auch mit dem migratorischen und invasiven Verhalten von Tumorzellen in Verbindung gebracht (Liu et al. 2015b). Zur Bedeutung von TLR4 im Nierenzellkarzinom gibt es nur erste Daten, die eine höhere Expression in der RCC-Zelllinie 786-O im Vergleich zu der normalen RCC-Zelllinie HK-2 zeigen (Yu et al. 2011). TLR4 wurde in der hier vorliegenden Arbeit jedoch erstmals auch als direktes Target von miR-145 beschrieben. Die miR-145 scheint auch einen leichten regulatorischen Einfluss auf die Expression von NRAS zu haben. Die Regulation der Expression von den bekannten Ras-Onkogenen spielt aber offensichtlich beim Nierenzellkarzinom keine sehr große Rolle (Suzuki et al. 1994).

Die Regulation von MAP4K4 durch miRNAs im Nierenzellkarzinom wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben. In anderen Zusammenhängen gibt es jedoch bereits einige Studien, die

MAP4K4 als Target von miRNAs wie miR-34c (Savarimuthu Francis et al. 2014), miR-194 (Wang et al. 2015), miR-622 (Song et al. 2015), miR-141 (Zhao et al. 2013) und miR-145 (Viana et al. 2014) beschreiben. Wie in dem hier untersuchten Patientenkollektiv gezeigt, korreliert eine erhöhte Expression von MAP4K4 mit einer verringerten Expression von miR-145 (Abbildung 27, S. 59). Erste Hinweise zu einer Regulation von MAP4K4 durch miR-145 wurden bereits in Hyperplasien der Prostata beschrieben, wobei jedoch noch kein Beweis eines direkten mechanistischen Zusammenhangs gezeigt wurde (Viana et al. 2014). In Pankreastumorzelllinien konnte MAP4K4 zudem als Target der miR-141 identifiziert werden (Zhao et al. 2013). Auch wenn die Expression von MAP4K4 und miR-141 in dem hier untersuchten Patientenkollektiv korrelierten (Abbildung 27, S. 59), konnte der regulatorische Zusammenhang in den durchgeführten Untersuchungen an Nierentumorzellen nicht bestätigt werden. Hier scheinen somit bei den Tumoren und Zelllinien unterschiedliche Mechanismen in die Regulation von MAP4K4 involviert zu sein.

Die pro-migratorischen Gene HS6ST2, LOX und MAP4K4, die hier als Targets der miR-145 identifiziert werden konnten, wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt und werden später diskutiert.

Funktion der miR-141

Wie bereits erwähnt gehört die miR-141 der Familie miR-200 an. *In-silico*-Analysen zeigten, dass sehr viele der potenziellen Targets der miR-200-Familienmitglieder an wichtigen tumorassoziierten Prozessen wie dem ErbB-Signalweg, der Regulation des Zytoskeletts und der fokalen Adhäsion beteiligt sind (Yoshino et al. 2013b). So konnte gezeigt werden, dass die Regulation dieser miRNA-Familie in vielen Tumoren eine Schlüsselrolle bei der Tumorprogression und speziell bei der epithelialen-mesenchymalen Transition einnimmt (Mongroo et al. 2010). Die miR-200-Familie scheint somit vor allem in Prozesse der Migration und Invasion involviert zu sein. Eine ihrer wesentlichsten Funktionen besteht dabei in der Regulation der mit dem mesenchymalen Phänotyp assoziierten ZEB-Transkriptionsfaktoren. Durch eine verringerte Expression von miR-141, wie sie in vielen Tumoren beobachtet werden kann, kommt es zu einer gesteigerten Expression von ZEB und folglich zu einer Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion und von E-Cadherin (Mongroo et al. 2010). ZEB2 konnte auch in Nierenkarzinomzellen als direktes Target der miR-141 bestätigt werden (Nakada et al. 2008). Durch die Überexpression der miR-141 ist es möglich, ZEB2 zu hemmen, wodurch es zu einer Re-expression des zuvor inhibierten E-Cadherins kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Prinzip genutzt, um die Wirksamkeit des angewendeten Transfektionsprotokolls zu belegen. Neben der Funktion bei der Regulation von migratorischen und invasiven Prozessen spielt die miR-200-Familie jedoch auch eine Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation. So führt eine Überexpression der Mitglieder dieser Familie zur Hemmung des Zellzyklus (Uhlmann et al. 2010). Als direktes Target von miR-141 im Nierenzellkarzinom konnte der proliferationsfördernde Zellzyklusregulator CDC25B identifiziert werden (Yu et al. 2013). Die miR-200-Familie verfügt somit über eine Reihe von tumorsuppressiven Funktionen. Auch bei

den funktionellen Analysen in dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass es durch die Überexpression von miR-141 zu einer Hemmung der Proliferation, der Migration und der Invasion von Nierentumorzellen kommt (Abbildung 20, S. 47; Abbildung 21, S. 48; Abbildung 22, S. 49). Diese Eigenschaften der miR-141 wurden mittlerweile auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Chen et al. 2014b; Chiyomaru et al. 2014). Zudem ist miR-141 in der Lage, die Tumorgenese in Xenografts zu inhibieren (Chen et al. 2014b).

Durch den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsansatz konnten weitere Targets der miR-141 identifiziert werden. Dazu gehören SLC16A3, EAPP, VRK2, TGFBR1, TGFB2, LOX und HS6ST2 (Abbildung 23, S. 53; Abbildung 24, S. 54). Bei SLC16A3, das auch unter MCT4 bekannt ist, handelt es sich um einen Laktattransporter, der vor allem in Tumorzellen mit hoher Glycolyserate stark exprimiert wird. Das anti-apoptotisch wirkende SLC16A3 wird auch in Nierenzellkarzinomen stark vermehrt exprimiert und ist mit einer schlechten Prognose für das rezidivfreie Überleben korreliert (Gerlinger et al. 2012; Kim et al. 2015). Die Regulation von SLC16A3 durch miR-141, wie sie hier anhand der Modellversuche für Nierenkarzinomzellen nachgewiesen wurde, war bislang unbekannt und ist hier zum ersten Mal beschrieben worden. Des Weiteren scheint miR-141 in der Lage zu sein, in den TGFB-Signalweg einzugreifen, wobei dieser durch die Regulation von zwei involvierten Targets TGFB2 und TGFBR1 gleich an mehreren Stellen inhibiert werden kann. Das TGFB-Signaling stellt eine wichtige Schnittstelle von proliferativen, migratorischen und invasiven Prozessen und auch EMT dar und ist vielfach an der Pathogenese des Nierenzellkarzinoms beteiligt (Bostrom et al. 2013). Erste Ergebnisse zur Rolle der miR-200-Familie im TGFB-Signalweg wurden auch bereits am Modell der Nierenfibrose gezeigt (Wang et al. 2011).

Synergistische Wirkung der miR-141 und miR-145

Wie hier am Beispiel der regulatorischen Effekte von miR-141 und miR-145 nachgewiesen wurde, hat die Wirkung einer einzelnen miRNA oft nur einen geringen Effekt auf die Regulation eines bestimmten zellulären Prozesses wie z. B. die Migration bzw. auf die Expression eines spezifischen Gens. Viele miRNAs wie auch miR-141 und miR-145 können jedoch mehrere Targets aus einem Signalweg gleichzeitig inhibieren, wodurch dieser Effekt verstärkt werden kann. Durch die Kombination von miRNAs mit funktionell ähnlichen Targets kann es so zu einer synergistischen Wirkung und einer damit verbundenen effektiveren Hemmung der entsprechenden Mechanismen kommen (Tsang et al. 2015). Die beiden miR-141 und miR-145 hatten jeweils schon als einzelne miRNAs einen Effekt auf die Migration von Nierenkarzinomzellen gezeigt. Durch die Kombination beider miRNAs konnte dann nochmal eine stärkere Inhibierung der Migration beobachtet werden (Abbildung 22, S. 49). Neben der Wirkung von unterschiedlichen miRNAs auf einen Signalweg oder Prozess durch die Regulation von unterschiedlichen Targets wurde auch die synergistische Hemmung eines einzelnen Targets durch mehrere miRNAs beschrieben (Han et al. 2015). Dies ist möglich, wenn der 3'UTR-Bereich des mRNA-Transkripts die komplementäre Sequenz zu

unterschiedlichen miRNA-*seed*-Sequenzen aufweist. Durch die kombinierte Regulation durch verschiedene miRNAs wird somit eine stärkere Hemmung des entsprechenden Targets erzielt (Han et al. 2015). Über eine synergistische Wirkung der beiden miR-141 und miR-145 war jedoch bisher nichts bekannt. In dieser Arbeit wurde mithilfe der beschriebenen Suchmaschine eine Liste von 100 potenziellen gemeinsamen Targets der miR-141 und miR-145 zusammengestellt. Von den 11 hiervon getesteten Targets zeigten die fünf Targets EAPP, VRK2, TGFB2, HS6ST2 und LOX eine Hemmung durch beide miRNAs (Abbildung 24, S. 54). Die Regulation dieser Targets kann somit durch beide miRNAs erfolgen, wobei jedoch die Effektivität der Hemmung sehr unterschiedlich und auch stark zelltypabhängig war. Die Kombination beider miRNAs bewirkte dagegen bei EAPP, VRK2 und TGFB2 keine verstärkte Hemmung. Bei den beiden Targets HS6ST2 und LOX konnte dagegen ein synergistischer Hemmeffekt durch die Kombination von miR-141 und miR-145 in den Modellversuchen an Nierenkarzinomzellen erzielt werden.

Die Heparansulfat-Sulfotransferase HS6ST2 spielt eine wichtige Rolle bei der Modifikation von Heparansulfaten, die eine ubiquitäre Komponente der Zelloberfläche, der ECM und der Basalmembran darstellen. Damit ist dieses Enzym an der Regulation einer Reihe von essenziellen zellulären Interaktionen und Prozessen beteiligt. Die Regulation dieser Mechanismen hat eine große Bedeutung für das Zellwachstum, die Differenzierung und auch die Migration von Zellen und steht somit auch in einem engen Zusammenhang mit der Entstehung und Progression von Tumoren (Bernfield et al. 1999). Die genaue Rolle von HS6ST2 in Tumoren ist jedoch noch nicht geklärt. So ist in einigen Tumoren eine reduzierte Expression zu beobachten (Cole et al. 2014), in anderen jedoch eine Überexpression (Hatabe et al. 2013; Waaijer et al. 2012). In Zelllinien des Pankreaskarzinoms konnte zudem eine Reduktion der Migration durch Hemmung von HS6ST2 erzielt werden (Song et al. 2011). Zur Bedeutung von HS6ST2 in Nierentumoren gibt es bislang noch keine Daten. Während, wie oben beschrieben, in 786-O-Zellen eine starke Hemmung der Expression von HS6ST2 durch die miR-141 und miR-145 einzeln sowie verstärkt durch Kombination der miRNAs auftrat, korrelierte die Expression sowohl von miR-141 als auch von miR-145 positiv mit der Expression von HS6ST2 im Nierennormal- und RCC-Gewebe (Abbildung 27, S. 59). Dies ergab sich aus den RT-qPCR-Analysen der Gewebeproben und unabhängig davon auch an anderen Gewebeproben auf einer Microarray-Plattform. Dies bedeutet, dass die vermutete Hemmung von HS6ST2 durch miR-141 und miR-145 aus der *in-silico*-Targetsuche sich zwar in zellulären Transfektionsexperimenten nachweisen, aber nicht am humanen Material bestätigen ließen. Es ist anzunehmen, dass andere Regulationsmechanismen, z. B. onkogen wirkende miRNAs, viel stärker die HS6ST2-Expression beeinflussen als miR-141 und miR-145. Andererseits könnte der hier erstmals beschriebene Hemmeffekt von miR-141 und miR-145 bei anderen Tumorentitäten, die sich durch eine erhöhte HS6ST2-Expression auszeichnen, von Bedeutung sein und bedarf der Überprüfung. Trotz des unerwarteten Ergebnisses ist dies ein anschauliches Beispiel dafür, dass zur Validierung von Experimenten an Zellkulturen stets auch entsprechende Untersuchungen an Gewebeproben vorgenommen

werden sollten. Dies ist in vielen Publikationen nicht der Fall, deren Schlussfolgerungen lediglich auf Zellkulturexperimenten beruhen.

Ein erster Zusammenhang zwischen der pro-migratorischen Lysyloxidase LOX und miR-145 wurde bisher lediglich bei kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (Kothapalli et al. 2012). In Tumoren war dagegen über eine Regulation durch miR-141 oder miR-145 bisher noch nichts bekannt. Wie oben bereits beschrieben, wurde die Expression von LOX in den Nierenkarzinomzelllinien sowohl durch Überexpression von miR-141 als auch durch miR-145 reduziert, womit LOX erstmals als ein weiteres Target dieser beiden miRNAs identifiziert werden konnte. In Nierenzellkarzinomzellen wirkten beide miRNAs dabei synergistisch auf LOX, sodass durch gemeinsame Überexpression eine drastische Hemmung der LOX-Expression erzielt wurde (Abbildung 24, S. 54). Aufgrund dieses Effekts wurde LOX für weitere Untersuchungen an Nephrektomiegewebeproben von Nierenzellkarzinompatienten ausgewählt und wird später näher diskutiert.

miRNA-basierte Biomarker und Therapie

Zurzeit gibt es noch keine effektive kurative Therapie für das metastasierte RCC. Aktuelle Therapeutika wie Tyrosinkinaseinhibitoren und Inhibitoren der Angiogenese sind lediglich in der Lage, die Lebensdauer der Patienten etwas zu verlängern. Trotz der erhofften Erfolge, durch anti-VEGF-gerichtete Therapien, zeigen oder entwickeln jedoch fast alle metastasierten Tumore eine Resistenz. Neue Biomarker auf Basis von miRNA-Profilen könnten helfen, diagnostische und prognostische Aussagen zu treffen und durch Risikostratifikation die Auswahl der Therapieoptionen zu unterstützen. Die Dysregulation der miR-141 und miR-145 ist bei Nierenzellkarzinomen offenbar stark ausgeprägt und spielt eine wichtige Rolle in der Pathologie. Daher würden sich diese beiden miRNAs als nützliche Biomarker anbieten, anhand deren Untersuchung im Primärtumormaterial z. B. eine potenzielle primäre Resistenz gegenüber der geplanten Therapie auszuschließen wäre. Bei Nachweis einer primären Resistenz könnten dem Patienten so unnötige Beschwerden durch Nebenwirkungen erspart bleiben, und außerdem würden erhebliche Kosten und Zeit für eine bei primärer Resistenz unwirksame Therapie vermieden werden.

miRNAs haben aber nicht nur das Potenzial als Biomarker, sondern könnten auch als Ansatz zur Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien dienen. Die komplexe miRNA-Biologie ermöglicht neue Therapieoptionen, stellt jedoch auch große Anforderungen an das Design neuer Medikamente. Ein großer Vorteil von miRNAs und damit gleichzeitig auch eine sehr große Herausforderung für ihren Therapieeinsatz ist ihre Fähigkeit, viele verschiedene Targets gleichzeitig regulieren zu können und somit viele tumorassoziierte Signalwege parallel zu modifizieren. Die veränderte Expression einer miRNA stellt bei der Tumorgenese aber lediglich ein sehr kleines Rädchen dar, das oftmals nur einen geringen Effekt auf den gesamten Tumor hat. Durch eine synergistische Regulation von zwei oder mehr miRNAs, wie sie hier für miR-141 und miR-145 gezeigt wurde, kann jedoch eine effektivere Repression des entsprechenden Targets bzw. Prozesses erzielt werden. Das Ziel wäre der individualisierte,

auf Tumor-Profiling beruhende Einsatz der miRNA-basierten Therapie. Das große Problem stellen jedoch die Abschätzung und Vermeidung von unerwünschten Nebeneffekten dar. miRNAs müssen aber auch nicht als direktes Target dienen, sondern können auch als Unterstützung einer vorhandenen Therapie eingesetzt werden, um z. B. die Bestrahlungssensitivität eines Tumors zu erhöhen (Josson et al. 2008).

Auch wenn erste Therapienansätze bereits in Phase-I-Studien getestet werden wie z. B. die miR-34-„Ersatz“ der Firma Mirna Therapeutics, Inc. (Bader 2012), so steckt die miRNA-basierte Therapie dennoch erst in ihren Kinderschuhen. Daher ist es zu früh, um abschätzen zu können, inwieweit der Einsatz von miRNAs in der Tumorthherapie tatsächlich realisierbar ist. Bisher ist noch zu wenig über die genauen Prozesse und die einzelnen regulatorischen Mechanismen bekannt, aber die neuen Erkenntnisse zu miRNAs zeigen einen vielversprechenden Weg auf, durch den Tumorerkrankungen individuell bekämpft werden könnten. Um einen wirkungsvollen, möglichst nebenwirkungsarmen Einsatz von miRNAs zu entwickeln, ist es jedoch zunächst unerlässlich, ein umfassendes Verständnis des gesamten Netzwerks zu gewinnen und sowohl die Regulation als auch die Funktion und Targets der miRNAs im Einzelnen zu verstehen.

4.4. Lysyloxidase und MAP4K4 im Nierenzellkarzinom

Im Folgenden werden die hier gewonnenen neuen Erkenntnisse über die beiden näher untersuchten Targets der miR-141 und/oder miR-145, die Lysyloxidase (LOX) und MAP4K4, mit den aus der Literatur bekannten Daten in Beziehung gebracht.

4.4.1. Lysyloxidase

Hier sind noch einmal als kurze Übersicht zusammengefasst die Daten der vorliegenden Untersuchungen, die die Lysyloxidase LOX als ein wichtiges Target der beiden miRNAs miR-141 und miR-145 beim Nierenzellkarzinom ausweisen:

- Überexpression von miR-141 bzw. miR-145 hemmt die LOX-Expression in RCC-Zelllinien
- Gemeinsame Überexpression von miR-141 und miR-145 hat einen verstärkten inhibierenden Effekt auf die LOX-Expression
- LOX-Expression in Gewebe von ccRCC ist stark erhöht im Vergleich zum Normalgewebe
- LOX-Expression ermöglicht die Trennung zwischen Normal- und Tumorgewebe und zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Primärtumoren
- Erhöhte LOX-Expression korreliert dabei mit verringerter Expression von miR-141 und miR-145 in Nierennormal- und ccRCC-Gewebe
- LOX-Expressionsmuster in ccRCC-Gewebe verfügt über prognostisches Potential zur Vorhersage des Gesamtüberlebens, ist jedoch kein unabhängiger Prognosefaktor

Die Lysyloxidase (LOX; Gene ID 4015; *protein-lysine 6-oxidase*) gehört mit den vier LOX-like-Genen (LOXL1, LOXL2, LOXL3 und LOXL4) zur Familie der sekretierten Lysyloxidasen. Dabei ist LOX das bisher am besten untersuchte Mitglied dieser Familie. Es wird zunächst als inaktives Prä-proenzym (preproLOX) mit einer Sequenzlänge von 417 Aminosäuren synthetisiert und nach Modifikation als inaktives 50 kDa großes Proenzym (proLOX) in die ECM sekretiert. Hier kommt es zur proteolytischen Spaltung in das 18 kDa große Propeptid (LOX-PP) und das 32 kDa große enzymatisch aktive Protein (LOX) (Payne et al. 2007). Das Expressionsmuster der fünf Lysyloxidasen unterscheidet sich stark voneinander und ist abhängig vom Gewebe, dem Zelltyp und der Entwicklungsstufe. LOX ist dabei weit verbreitet in Geweben zu finden (Liu et al. 2004; Molnar et al. 2003).

LOX ist eine Cu²⁺-abhängige Aminoxydase, deren katalytische Domäne hoch konserviert ist (Butler et al. 1987; Molnar et al. 2005). Die primäre Aufgabe von LOX besteht in der Modifikation von Lysinresten in Strukturproteinen der ECM wie Kollagen und Elastin, die zu einer Vielzahl von inter- und intramolekularen Interaktionen führt. Durch diese Quervernetzungen wird die Stabilität und Zugfestigkeit der ECM beeinflusst. LOX spielt somit eine zentrale Rolle bei der Bildung und Erhaltung der ECM und reguliert die Struktur und den Zusammenhalt des Gewebes (Mayorca-Guilliani et al. 2013). Die zentrale Bedeutung der Lysyloxidase-Familie für weitere Prozesse wie die Entwicklung von Organen und die

Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere konnte bereits vielfach an Knockout-Mäusen belegt werden (Hornstra et al. 2003; Maki et al. 2002).

Bisher gibt es noch keine immunohistologische Analysen von LOX im Nierengewebe. Wie in den hier durchgeführten histologischen Untersuchungen gezeigt, ist LOX im ccRCC in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten lokalisiert, wobei die Verteilung von LOX offenbar Auswirkungen auf die Aggressivität des ccRCC hat (Abbildung 31, S. 65). LOX ist in vielen unterschiedlichen Gewebetypen vorwiegend im extrazellulären Kompartiment zu finden. In einigen Zelltypen wie z. B. in glatten Muskelzellen von Gefäßen und in Fibroblasten konnten das reife LOX sowie dessen enzymatische Aktivität jedoch auch im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen werden (Jansen et al. 2007; Kagan et al. 2003; Li et al. 1997; Lucero et al. 2006; Nellaiappan et al. 2000; Wakasaki et al. 1990). LOX wird zunächst in die ECM sekretiert, dort prozessiert und anschließend als reifes Enzym wieder aktiv in das Zytoplasma bzw. den Zellkern transportiert (Nellaiappan et al. 2000). Diese Beobachtungen zeigen, dass LOX neben seiner Funktion in der ECM offenbar auch Aufgaben im Inneren der Zelle übernimmt. LOX verfügt über keine sehr hohe Substratspezifität (Lucero et al. 2006). So konnten Untersuchungen nachweisen, dass LOX auch Histon H1 und H2 sowie den Wachstumsfaktor FGF2 als Substrat nutzen kann (Giampuzzi et al. 2003; Kagan et al. 1983; Li et al. 2003; Mello et al. 1995). LOX scheint daher je nach zellulärer Lokalisation auch an weiteren extra- und intrazellulären Prozessen wie der Signalübertragung und der transkriptionellen Genregulation beteiligt zu sein. Neueste Ergebnisse zeigten, dass die zelluläre Lokalisation des LOX-Proteins in Gewebe von Astrozytomen im Zusammenhang mit der Malignität des Tumors steht (da Silva et al. 2015). Hier wiesen Tumore mit höherem Malignitätsgrad eine höhere Menge an nukleärem LOX auf, während das zytoplasmatische LOX nicht variierte. Bei der in dieser Doktorarbeit durchgeführten Analyse der LOX-Proteinexpression im Gewebe von ccRCCs zeigte sich, dass Patienten mit einer stärkeren apikalen als zytoplasmatischen Lokalisierung von LOX eine bessere Prognose für das Gesamtüberleben aufwiesen. Dies könnte entsprechend auf dessen unterschiedliche Funktionen je nach Zellkompartiment zurückzuführen sein. In einer multivariaten Analyse konnte die LOX-Expression jedoch nicht als unabhängiger Prognosemarker identifiziert werden. Limitierend für die Aussagekraft der Ergebnisse im ccRCC ist jedoch die geringe Fallzahl der Patientengruppe mit $LOX_a > LOX_z$.

Die Expression von LOX wird in der Entwicklung streng reguliert. Veränderte Expressionen bzw. enzymatische Aktivitäten stehen im engen Zusammenhang mit kardiovaskulären und (Alcudia et al. 2008) neurodegenerativen Erkrankungen (Gilad et al. 2005) sowie mit Fibrosen (Vadasz et al. 2014) und auch Tumoren (Perryman et al. 2014). Erhöhte LOX-Aktivität wurde bei fibrösen Erkrankungen wie Arteriosklerose, Sklerodermie und Leberzirrhose sowie bei Bildung von senilen Plaques bei Alzheimer- und nicht Alzheimer-bedingter Demenz gefunden (Chanoki et al. 1995; Gilad et al. 2005; Kagan et al. 1981; Kagan 1994). In Tumoren nimmt LOX eine duale Rolle als Tumorsuppressor oder als Förderer der Tumorprogression ein. Dabei ist LOX in Abhängigkeit von der zellulären Lokalisation, vom Zelltyp und Transformationsstatus

hoch- oder herunterreguliert (Kaneda et al. 2004; Kirschmann et al. 2002; Payne et al. 2005; Payne et al. 2007). Zur funktionellen Untersuchung von LOX stehen mittlerweile Substanzen wie β -Aminopropionitrile zur Verfügung, die eine irreversible Hemmung der LOX-Aktivität ermöglichen (Narayanan et al. 1972). So konnte die Beteiligung von LOX an einer Reihe für die Kanzerogenese entscheidende Prozesse wie die Genexpression, Motilität und Migration von Zellen, Zelladhäsion, Zellpolarität und EMT nachgewiesen werden.

Da viele Tumore wie das Basal- und Plattenepithelkarzinom (Bouez et al. 2006), Bronchialkarzinom (Woznick et al. 2005), Chorionkarzinom (Hamalainen et al. 1995), Kolonkarzinom (Csiszar et al. 2002), Fibrosarkom (Hamalainen et al. 1995), Magenkarzinom (Kaneda et al. 2004) und Pankreaskarzinom (Kaneda et al. 2004) sowie Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (Rost et al. 2003) eine verringerte LOX-Aktivität und -Expression zeigen, wurde zunächst angenommen, dass LOX der Tumorprogression entgegenwirkt. So konnte in Mammakarzinomzellen gezeigt werden, dass LOX in der Lage ist, durch Reduktion der Akt/PI3K-Aktivität den Zellwachstum-regulierenden Transkriptionsfaktor NF- κ B zu hemmen und so die Progression zu unterbinden (Min et al. 2007). Für diese tumorsuppressive Wirkung ist jedoch nicht das enzymatisch aktive LOX, sondern das abgespaltene LOX-PP verantwortlich (Palamakumbura et al. 2004).

In einer Reihe von Tumorzelllinien bzw. den entsprechenden Tumorgeweben ist LOX jedoch erhöht exprimiert. Dies gilt für Tumore der Brust (Erler et al. 2006; Kirschmann et al. 2002), des Kopf-Hals-Bereichs (Erler et al. 2006), der Lunge (Borczuk et al. 2005), der Prostata (Kirschmann et al. 2002), des Kolons (Baker et al. 2013a) sowie in Melanomen (Kirschmann et al. 2002) und Osteosarkomen (Fuchs et al. 2000). Zudem wurde auch in tumorassoziierten Endothelzellen und Stromazellen wie Fibroblasten eine hohe LOX-Expression nachgewiesen (Osawa et al. 2013; Pickup et al. 2013). Die LOX-Expression ist dabei in einigen der Tumoren eng mit klinischen Parametern korreliert. Eine erhöhte LOX-Expression gilt dabei als negativer Prognosefaktor, der sich in einer erhöhten Rezidivrate und geringem Gesamtüberleben manifestiert (Erler et al. 2006). Mikroarray-Daten aus der Literatur wie auch aus dem hier ausgewerteten Array, geben bereits erste Hinweise auf eine Überexpression von LOX im Nierenzellkarzinom (Takahashi et al. 2001; Young et al. 2001). Zudem wurde Stassar und Kollegen gezeigt, dass LOX in 5 von 9 RCC-Geweben erhöht exprimiert wurde (Stassar et al. 2001). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit an einer größeren Patientengruppe auf mRNA-Ebene ebenfalls bestätigt werden. Hierbei wurde eine signifikant höhere Expression von LOX im Tumorgewebe von ccRCC-Patienten im Vergleich zum angrenzenden normalen Nierengewebe festgestellt (Abbildung 26, S. 58). Zudem ermöglichte die LOX-mRNA-Expression nicht nur die Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe sondern auch eine prädiktive Aussage zum Vorliegen von Metastasen (Tabelle 11, S. 60). Interessant ist, dass LOX auch bei anderen Geweben vorwiegend bei invasiven Tumoren stark erhöht exprimiert wird (Kirschmann et al. 2002). Eine pharmakologische oder Antikörper-vermittelte Hemmung von LOX hatte zwar keinen Einfluss auf das Wachstum von Mamakarzinomen, bewirkte aber eine Reduktion der Metastasierung (Erler et al. 2006). Auch für

Nierenkarzinomzelllinien (A498) gibt es erste Daten, die eine Korrelation zwischen einer chemotherapeutisch-induzierten Verringerung der Migration mit einer verringerten LOX-Expression belegen (Tanaka et al. 2012). Somit spielt LOX offenbar eine wichtige Rolle in einem späteren Stadium der Tumorprogression und ist vermutlich auch beim Nierenzellkarzinom am Übergang vom lokal begrenzten zum metastasierten Tumor beteiligt.

In der Literatur gibt es bereits eine Reihe von Hinweisen zu den Mechanismen, die verantwortlich für die metastasierungsfördernden Eigenschaften von LOX sein können. So fördert die Überexpression von LOX die Quervernetzung und Versteifung der ECM. Dies, aber auch die katalytische Interaktion mit bisher unbekannten Substraten, hat eine Aktivierung von Signalwegen wie Src/FAK (*focal adhesion kinase*) und p130^{Cas}/Crk/DOCK180, eine Umstrukturierung des Zytoskeletts und eine vermehrte Bildung von Fokaladhäsionen zur Folge, die die Motilitäts- und Invasionseigenschaften von Tumorzellen erhöhen (Erler et al. 2006; Payne et al. 2005; Payne et al. 2006). Außerdem ist LOX als transkriptionelles Target des Transkriptionsfaktors HIF an der Hypoxie-vermittelten Metastasierung von Tumoren beteiligt (Erler et al. 2006; Perryman et al. 2014). In Nierentumorzellen hemmt eine vermehrte LOX-Expression E-Cadherin und fördert so die Migration von primären Nierenepithelzellen (Higgins et al. 2007; Schietke et al. 2010). LOX scheint jedoch auch in der Lage zu sein, durch PDGFR β - und Akt-vermittelte Erhöhung der VEGF-Expression Angiogenese zu induzieren (Baker et al. 2013b). So konnte gezeigt werden, dass tumorassoziierte Endothelzellen im Vergleich zu normalen Endothelzellen vermehrt LOX exprimieren und dass dies eng mit deren Proliferation, Migration und Neubildung von Gefäßen verbunden ist (Baker et al. 2013b; Osawa et al. 2013). Diese pathologische Neoangiogenese bei Tumoren ist entscheidend für das Tumorwachstum und die Metastasierung. Des Weiteren scheint in der Blutbahn zirkulierendes LOX, das von Mammakarzinomen sekretiert wird, die Bildung von prämetastatischen Nischen in Knochen, Lunge und Leber zu fördern. Dadurch wird das Einwandern, die Festsetzung, das Überleben und das Wachstum der neu ankommenden Tumorzellen ermöglicht und somit die Metastasenbildung erleichtert (Cox et al. 2013; Cox et al. 2015; Erler et al. 2006; Wong et al. 2011). LOX könnte damit einen vielversprechenden Biomarker für das Erkennen von Patienten mit erhöhtem Risiko für Metastasenformation darstellen oder sogar als Target für die präventive Therapie dieser Patienten dienen.

LOX greift also in eine Reihe von grundlegenden zellulären Prozessen ein und kann so zur Förderung der Metastasierung beitragen. Daher stellt LOX ein sehr interessantes Zielmolekül dar und wird in der Literatur bereits als vielversprechender neuer Therapieansatz diskutiert (Barker et al. 2012). Die Entwicklung entsprechender Medikamente durch traditionelles Medikamentendesign gestaltet sich jedoch bisher schwierig, da die genaue Kristallstruktur noch nicht bekannt ist. Auch stehen geeignete spezifische „small molecule“-Inhibitoren oder monoklonale Antikörper momentan noch nicht zur Verfügung (Perryman et al. 2014). Eine alternative Möglichkeit zur Inhibierung der LOX-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden. Die erhöhte Expression von LOX korrelierte in klarzelligen Nierenzellkarzinomen signifikant mit einer verringerten Expression der beiden miR-141 und

miR-145 (Abbildung 27, S. 59). Durch Überexpression der beiden miR-141 und miR-145 könnte so eine starke Reduktion der LOX-Expression erzielt werden. Eine miRNA-Replacement-Therapie, wie sie von der Firma Mirna Therapeutics, Inc. für miR-34 in einer Phase-I-Studie bereits eingesetzt wird (Bader 2012), wäre somit durchaus denkbar.

4.4.2. MAP4K4

Bei dem zweiten in dieser Arbeit genauer untersuchten Target handelt es sich um MAP4K4. Auch hierfür noch einmal zusammengefasst die erhobenen Daten, die MAP4K4 als ein wichtiges Target der miR-145 beim Nierenzellkarzinom belegt:

- Überexpression von miR-145 hemmt die MAP4K4-Expression in Nierenkarzinomzelllinien
- MAP4K4-Expression im Gewebe von klarzelligen Nierenzellkarzinomen ist erhöht im Vergleich zum Normalgewebe
- MAP4K4-Expression ermöglicht die diagnostische Trennung zwischen Normal- und Tumorgewebe
- Erhöhte MAP4K4-Expression im Nierenzellkarzinom korreliert dabei mit verringerter Expression von miR-145
- MAP4K4-Expression ist mit klinisch-pathologischen Patientendaten assoziiert
- MAP4K4-Expression verfügt über prognostische Aussagekraft für das Gesamtüberleben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom

MAP4K4 (Gene ID: 9448; *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4*; alias HGK) ist eine der Kinasen der Serin/Threonin-Proteinkinase-Familie, die alle in eine Reihe von hoch konservierten Signalwegen involviert sind. In bisherigen Studien wurde eine erhöhte Expression von MAP4K4 in Gewebeproben verschiedener Karzinome im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe beschrieben (Collins et al. 2006; Hao et al. 2010; Liang et al. 2008; Liu et al. 2011; Qiu et al. 2012). Die Überexpression von MAP4K4 erwies sich dabei als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben von Patienten mit Leberkarzinom (Liu et al. 2011), Pankreaskarzinom (Liang et al. 2008), Lungenkarzinom (Qiu et al. 2012) und kolorektalen Karzinom (Hao et al. 2010). Zur Expression und klinischen Relevanz von MAP4K4 im Nierenzellkarzinom gibt es bisher keine publizierten Daten. Die in dieser Doktorarbeit durchgeführten RT-qPCR-Messungen und immunhistochemischen Untersuchungen an den TMA-Proben von klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten nicht nur das diagnostische Potenzial von MAP4K4 in der Diskrimination zwischen Tumor- und Normalgewebe (Tabelle 11, S. 60), sondern auch das Potenzial für die Vorhersage hinsichtlich des Gesamtüberlebens der Patienten nach der Tumornephrektomie (Abbildung 33, S. 69; Tabelle 15, S. 70). Eine hohe MAP4K4-Expression auf Proteinebene erwies sich dabei als ein negativer Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der Patienten in der Kaplan-Meier-Analyse bzw. Cox-Regressionsanalyse. In der multivariaten Analyse konnte jedoch keine Unabhängigkeit der MAP4K4-Expression von anderen klinisch-pathologischen Faktoren gezeigt werden.

MAP4K4 ist über ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionen in viele wichtige zelluläre Prozesse involviert. Hierzu gehört die Beteiligung an der Regulation von inflammatorischen Prozessen durch die Zytokin-vermittelten Aktivierung von T-Zellen (Mack et al. 2005). Dabei ist MAP4K4 für die Übertragung von Stress- und Zytokinsignalen (TNF α) verantwortlich (Yao et al. 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass MAP4K4 ein upstream Aktivator von *c-JUN terminal kinases 1 und 2* (JNK1/2), *extracellular signal-related kinase 1/2* (ERK1/2) und *p38 SAP kinase* ist (Bouzakri et al. 2007; Collins et al. 2006; Wright et al. 2003; Zohn et al. 2006). MAP4K4 ist aber auch in einer Reihe von tumorassoziierten Prozessen wie der Zellproliferation, Apoptose, Migration und Invasion beteiligt (Liu et al. 2011; Song et al. 2015). Am besten untersucht ist dabei die Rolle von MAP4K4 bei Mechanismen, die die Motilität von Zellen betreffen. Schon früh konnte gezeigt werden, dass MAP4K4 für wichtige Abläufe in der Entwicklung von Drosophilafliegen und Mäusen verantwortlich ist, die mit zellmigratorischen Prozessen verbunden sind (Su et al. 1998; Xue et al. 2001). Die entscheidende Rolle von MAP4K4 bei der Signalübertragung in migratorischen und invasiven Prozessen konnte dann auch für Tumorzellen belegt werden. So war es möglich, durch Hemmung von MAP4K4 mithilfe von small interfering RNAs die Migration und Invasion von Zelllinien des Ovarial-, Mamma-, Prostata- und Leberkarzinoms zu reduzieren (Collins et al. 2006; Han et al. 2010; Loftus et al. 2013). Wie bereits erwähnt kann MAP4K4 über ein TNF α -vermitteltes Signal aktiviert werden. Dies führt zu einer gesteigerten Migration von Zellen (Ma et al. 2014). MAP4K4 kann somit ein inflammatorisches Signal von Zytokinen in zelluläre Prozesse der Motilität übersetzen. MAP4K4 kann aber auch durch Wachstumssignale wie c-Met aktiviert werden (Santhana et al. 2015). Dadurch wird die Dynamik und Struktur des Aktinzytoskeletts modifiziert und so eine erhöhte Zellmotilität erreicht. So ist MAP4K4 in der Lage, ein Wachstumssignal durch Umstrukturierung des Zytoskeletts mit einer gesteigerten Migration und Invasion zu verbinden (Santhana et al. 2015). Dabei erfolgt der Aufbau der Aktinfilamente über die MAP4K4-vermittelte Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (LeClaire et al. 2015). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von MAP4K4 an EMT. So wurde beobachtet, dass während der murinen Gastrulation eine MAP4K4-induzierte Aktivierung von p38 zu einer Herunterregulation von E-Cadherin führt und MAP4K4 somit zu EMT beitragen kann (Zohn et al. 2006). MAP4K4 scheint daher durch die Regulation des Zytoskeletts die Migration und Adhäsion von Tumorzellen zu beeinflussen.

Inwieweit MAP4K4 in diese Prozesse auch beim Nierenzellkarzinom involviert ist, wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Dies würde jedoch eine mögliche neue Therapiestrategie für das Nierenzellkarzinom bieten, da bereits erste Anstrengungen unternommen wurden, um geeignete in der Therapie einsetzbare Inhibitoren von MAP4K4 zu entwickeln (Crawford et al. 2014). Wie in den hier vorliegenden Untersuchungen gezeigt wurde, kann durch die Überexpression von miR-145 eine Reduktion der MAP4K4-Expression in Nierenkarzinomzellen von über 50 % erzielt werden (Abbildung 23, S. 53). Dies könnte somit ein weiterer therapeutischer Ansatz sein, um die MAP4K4-Expression in Nierenzellkarzinomen zu inhibieren.

4.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Aufgrund der immer noch sehr schlechten Prognose für Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom besteht der dringende Bedarf nach neuen Therapiestrategien und prognostischen wie auch diagnostischen Markern, mit deren Hilfe Hochrisikopatienten identifiziert werden können. Wie deutlich gezeigt werden konnte, spielen durch epigenetische Mechanismen inhibierte miRNAs sowie deren spezifische Targets in der Progression des Nierenzellkarzinoms eine entscheidende Rolle. Der gesamte Prozess vom fehlerhaften Methylierungsmuster über die dysregulierten, tumorsuppressiven miRNAs bis hin zur veränderten Expression der onkogenen Targets bietet eine Vielzahl von vielversprechenden Ansatzpunkten für die Entwicklung und Etablierung von neuen Biomarkern oder sogar Therapieansätze.

Mit den in der vorliegenden Dissertation dargestellten Ergebnissen konnte ein Beitrag zur aktuellen miRNA-Forschung beim Nierenzellkarzinom geleistet werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die untersuchten miR-141 und miR-145 wichtige Regulatoren bei der Entwicklung und Progression des Nierenzellkarzinoms sind, in dem sie eine Vielzahl von tumorassoziierten Targets beeinflussen. Dies wurde speziell an den ausgewählten Targets LOX und MAP4K4, ausgehend über die Targetsuche für miR-141 und miR-145 über entsprechende Zellkulturversuche bis zu den Nachweisen an Gewebematerialien von Patienten belegt. Hierzu wurden verschiedene molekularbiologische und immunhistochemische Techniken eingesetzt. Diese beiden Targets verfügen, wie auch die beiden miRNAs selber, über ein diagnostisches bzw. prognostisches Potenzial, das nach weiterer Validierung in größeren Studien zur Entwicklung neuer Marker führen könnte. Das hier nur in Ansätzen vorgestellte veränderte Methylierungsprofil der miRNA-Promotorbereiche könnte ebenfalls diagnostisch von Bedeutung sein, aber auch durch die Reversibilität der epigenetischen Modifikationen als therapeutisches Ziel genutzt werden. Einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung des Nierenzellkarzinoms stellt jedoch die synergistische Wirkung der tumorsuppressiven miRNAs dar, durch deren kombinierten Einsatz ein größerer Effekt bei geringeren Nebenwirkungen erzielt werden könnte. Die miRNA- und Epigenetik-basierte Therapie steht jedoch noch an ihren Anfängen. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die therapeutische Hemmung der überexprimierten Targets. Hierbei ist auch die weitere Analyse der anderen, hier nur am Rande vorgestellten Targets von großem Interesse für das weitere Verständnis des Nierenzellkarzinoms und eine mögliche Berücksichtigung in therapeutischen Überlegungen. Wenn man jedoch therapeutisch in diesen Mechanismus eingreifen möchte, ist zunächst ein Gesamtverständnis aller hierbei ablaufenden Prozesse nötig, um Risiken abschätzen zu können und eine bestmögliche Strategie zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit hat zwar, wie ich hoffe dargestellt zu haben, zu zahlreichen neuen Erkenntnissen geführt, sie ist aber, wie es ja wissenschaftlichen Arbeiten immer sind, auch der Ausgangspunkt von neuen Fragen und damit zukunftsfähigen weiterführenden Projekten.

5. Literaturverzeichnis

- Accerbi M, Schmidt SA, De Paoli E, Park S, Jeong DH, and Green PJ. Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species. *Methods Mol Biol* 2010; 592: 31-50.
- Adams BD, Kasinski AL, and Slack FJ. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Curr Biol* 2014; 24: R762-R776.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science 2008; 4th Edition.
- Alcudia JF, Martinez-Gonzalez J, Guadall A, Gonzalez-Diez M, Badimon L, and Rodriguez C. Lysyl oxidase and endothelial dysfunction: mechanisms of lysyl oxidase down-regulation by pro-inflammatory cytokines. *Front Biosci* 2008; 13: 2721-27.
- Aubert S, Fauquette V, Hemon B, Lepoivre R, Briez N, Bernard D et al. MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Res* 2009; 69: 5707-15.
- Bader AG. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet* 2012; 3: 120.
- Baker AM, Bird D, Lang G, Cox TR, and Erler JT. Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK. *Oncogene* 2013a; 32: 1863-68.
- Baker AM, Bird D, Welte JC, Gourlaouen M, Lang G, Murray GI et al. Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2013b; 73: 583-94.
- Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006; 5: 29.
- Barker HE, Cox TR, and Erler JT. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 540-52.
- Bellail AC, Qi L, Mulligan P, Chhabra V, and Hao C. TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges. *Rev Recent Clin Trials* 2009; 4: 34-41.
- Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 729-77.
- Bertsch U, Roder C, Kalthoff H, and Trauzold A. Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: emerging role of nuclear TRAIL-R2. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1390.
- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, and Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D149-D153.
- Bhaumik SR, Smith E, and Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 1008-16.
- Bindra RS, Vasselli JR, Stearman R, Linehan WM, and Klausner RD. VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells. *Cancer Res* 2002; 62: 3014-19.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- Blick C, Ramachandran A, McCormick R, Wigfield S, Cranston D, Catto J et al. Identification of a hypoxia-regulated miRNA signature in bladder cancer and a role for miR-145 in hypoxia-dependent apoptosis. *Br J Cancer* 2015; 113: 634-44.
- Boehm M and Slack FJ. MicroRNA control of lifespan and metabolism. *Cell Cycle* 2006; 5: 837-40.
- Bonnans C, Chou J, and Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 786-801.
- Borcuk AC, Kim HK, Yegen HA, Friedman RA, and Powell CA. Lung adenocarcinoma global profiling identifies type II transforming growth factor-beta receptor as a repressor of invasiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 729-37.

- Bostrom AK, Lindgren D, Johansson ME, and Axelson H. Effects of TGF-beta signaling in clear cell renal cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 435: 126-33.
- Bouez C, Reynaud C, Noblesse E, Thepot A, Gleyzal C, Kanitakis J et al. The lysyl oxidase LOX is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1463-69.
- Bouzakri K and Zierath JR. MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance. *J Biol Chem* 2007; 282: 7783-89.
- Brown R and Plumb JA. Demethylation of DNA by decitabine in cancer chemotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004; 4: 501-10.
- Brugarolas J. PBRM1 and BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma. *Cancer J* 2013; 19: 324-32.
- Bussolati B, Moggio A, Collino F, Aghemo G, D'Armento G, Grange C et al. Hypoxia modulates the undifferentiated phenotype of human renal inner medullary CD133+ progenitors through Oct4/miR-145 balance. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302: F116-F128.
- Butler E, Hardin J, and Benson S. The role of lysyl oxidase and collagen crosslinking during sea urchin development. *Exp Cell Res* 1987; 173: 174-82.
- Byler TK and Bratslavsky G. Hereditary renal cell carcinoma: genetics, clinical features, and surgical considerations. *World J Urol* 2014; 32: 623-30.
- Cai J. Roles of transcriptional factor Snail and adhesion factor E-cadherin in clear cell renal cell carcinoma. *Exp Ther Med* 2013; 6: 1489-93.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-29.
- Cao Y, Hoepfner LH, Bach S, E G, Guo Y, Wang E et al. Neuropilin-2 promotes extravasation and metastasis by interacting with endothelial alpha5 integrin. *Cancer Res* 2013; 73: 4579-90.
- Carleton M, Cleary MA, and Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 2007; 6: 2127-32.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309: 1559-63.
- Carrington JC and Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 2003; 301: 336-38.
- Chambers AF and Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1260-70.
- Chang L, Guo F, Huo B, Lv Y, Wang Y, and Liu W. Expression and clinical significance of the microRNA-200 family in gastric cancer. *Oncol Lett* 2015; 9: 2317-24.
- Chanoki M, Ishii M, Kobayashi H, Fushida H, Yashiro N, Hamada T et al. Increased expression of lysyl oxidase in skin with scleroderma. *Br J Dermatol* 1995; 133: 710-15.
- Chaulk SG, Thede GL, Kent OA, Xu Z, Gesner EM, Veldhoen RA et al. Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol* 2011; 8: 1105-14.
- Chen D, Gassenmaier M, Maruschke M, Riesenberger R, Pohla H, Stief CG et al. Expression and prognostic significance of a comprehensive epithelial-mesenchymal transition gene set in renal cell carcinoma. *J Urol* 2014a; 191: 479-86.
- Chen X, Dong C, Law PT, Chan MT, Su Z, Wang S et al. MicroRNA-145 targets TRIM2 and exerts tumor-suppressing functions in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2015;
- Chen X, Wang X, Ruan A, Han W, Zhao Y, Lu X et al. miR-141 is a key regulator of renal cell carcinoma proliferation and metastasis by controlling EphA2 expression. *Clin Cancer Res* 2014b; 20: 2617-30.
- Cheng T, Wang L, Li Y, Huang C, Zeng L, and Yang J. Differential microRNA expression in renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 2013; 6: 769-76.
- Chiyomaru T, Fukuhara S, Saini S, Majid S, Deng G, Shahryari V et al. Long non-coding RNA HOTAIR is targeted and regulated by miR-141 in human cancer cells. *J Biol Chem* 2014; 289: 12550-65.

- Cho NH, Shim HS, Rha SY, Kang SH, Hong SH, Choi YD et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003; 44: 560-66.
- Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-59.
- Cichon MA and Radisky DC. Extracellular matrix as a contextual determinant of transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and in cancer. *Cell Adh Migr* 2014; 8: 588-94.
- Cohen HT and McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2477-90.
- Cole CL, Rushton G, Jayson GC, and Avizienyte E. Ovarian cancer cell heparan sulfate 6-O-sulfotransferases regulate an angiogenic program induced by heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor/EGF receptor signaling. *J Biol Chem* 2014; 289: 10488-501.
- Collins CS, Hong J, Sapinoso L, Zhou Y, Liu Z, Micklash K et al. A small interfering RNA screen for modulators of tumor cell motility identifies MAP4K4 as a promigratory kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3775-80.
- Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, and Benos PV. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One* 2009; 4: e5279.
- Cox TR, Bird D, Baker AM, Barker HE, Ho MW, Lang G et al. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res* 2013; 73: 1721-32.
- Cox TR, Rumney RM, Schoof EM, Perryman L, Hoyer AM, Agrawal A et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 2015; 522: 106-10.
- Crawford TD, Ndubaku CO, Chen H, Boggs JW, Bravo BJ, Delatorre K et al. Discovery of selective 4-Amino-pyridopyrimidine inhibitors of MAP4K4 using fragment-based lead identification and optimization. *J Med Chem* 2014; 57: 3484-93.
- Crispen PL, Boorjian SA, Lohse CM, Leibovich BC, and Kwon ED. Predicting disease progression after nephrectomy for localized renal cell carcinoma: the utility of prognostic models and molecular biomarkers. *Cancer* 2008; 113: 450-60.
- Csiszar K, Fong SF, Ujfalusi A, Krawetz SA, Salvati EP, Mackenzie JW et al. Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors. *Int J Cancer* 2002; 97: 636-42.
- da Silva R, Uno M, Marie SK, and Oba-Shinjo SM. LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of IDH1 mutation. *PLoS One* 2015; 10: e0119781.
- Dabestani S, Marconi L, Hofmann F, Stewart F, Lam TB, Canfield SE et al. Local treatments for metastases of renal cell carcinoma: a systematic review. *Lancet Oncol* 2014; 15: e549-e561.
- Davalos V and Esteller M. MicroRNAs and cancer epigenetics: a macrorevolution. *Curr Opin Oncol* 2010; 22: 35-45.
- Davis-Dusenbery BN and Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 2010; 148: 381-92.
- de Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC, Klausner RD, Gnarr JR, Pause A et al. Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel-Lindau (VHL)(-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1387-92.
- Diaz-Martin J, Diaz-Lopez A, Moreno-Bueno G, Castilla MA, Rosa-Rosa JM, Cano A et al. A core microRNA signature associated with inducers of the epithelial-to-mesenchymal transition. *J Pathol* 2014; 232: 319-29.
- Doberstein K, Steinmeyer N, Hartmetz AK, Eberhardt W, Mittelbronn M, Harter PN et al. MicroRNA-145 targets the metalloprotease ADAM17 and is suppressed in renal cell carcinoma patients. *Neoplasia* 2013; 15: 218-30.
- Doench JG and Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004; 18: 504-11.
- Donzelli S, Mori F, Bellissimo T, Sacconi A, Casini B, Frixia T et al. Epigenetic silencing of miR-145-5p contributes to brain metastasis. *Oncotarget* 2015; 6: 35183-201

- Dweep H, Sticht C, Pandey P, and Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 2011; 44: 839-47.
- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, and Sesternhenn IA. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press: Lyon 2004.
- Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440: 1222-26.
- Esquela-Kerscher A and Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-69.
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 286-98.
- Fang Y, Wei J, Cao J, Zhao H, Liao B, Qiu S et al. Protein expression of ZEB2 in renal cell carcinoma and its prognostic significance in patient survival. *PLoS One* 2013; 8: e62558.
- Feinberg AP and Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 143-53.
- Fleige S and Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 126-39.
- Franovic A, Gunaratnam L, Smith K, Robert I, Patten D, and Lee S. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13092-97.
- Frantz C, Stewart KM, and Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123: 4195-200.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, and Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.
- Fu HY, Li C, Yang W, Gai XD, Jia T, Lei YM et al. FOXP3 and TLR4 protein expression are correlated in non-small cell lung cancer: implications for tumor progression and escape. *Acta Histochem* 2013; 115: 151-57.
- Fuchs B, Zhang K, Bolander ME, and Sarkar G. Identification of differentially expressed genes by mutually subtracted RNA fingerprinting. *Anal Biochem* 2000; 286: 91-98.
- Fuhrman SA, Lasky LC, and Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655-63.
- Gad S, Lefevre SH, Khoo SK, Giraud S, Vieillefond A, Vasiliu V et al. Mutations in BHD and TP53 genes, but not in HNF1beta gene, in a large series of sporadic chromophobe renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2007; 96: 336-40.
- Gadducci A, Sergiampietri C, Lanfredini N, and Guiggi I. Micro-RNAs and ovarian cancer: the state of art and perspectives of clinical research. *Gynecol Endocrinol* 2014; 30: 266-71.
- Gallou C, Joly D, Mejean A, Staroz F, Martin N, Tarlet G et al. Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat* 1999; 13: 464-75.
- Ganesan A, Nolan L, Crabb SJ, and Packham G. Epigenetic therapy: histone acetylation, DNA methylation and anti-cancer drug discovery. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9: 963-81.
- Gao P, Xing AY, Zhou GY, Zhang TG, Zhang JP, Gao C et al. The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion-metastasis cascade in gastric cancer. *Oncogene* 2013; 32: 491-501.
- Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, and Condorelli G. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Curr Mol Med* 2012; 12: 27-33.
- Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, and Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12: 580-87.
- Ge P, Yu X, Wang ZC, and Lin J. Aberrant Methylation of the 1p36 Tumor Suppressor Gene RIZ1 in Renal Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 4071-75.
- Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* 2014; 46: 225-33.

- Gerlinger M, Santos CR, Spencer-Dene B, Martinez P, Endesfelder D, Burrell RA et al. Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target. *J Pathol* 2012; 227: 146-56.
- Geybels MS, Zhao S, Wong CJ, Bibikova M, Klotzle B, Wu M et al. Epigenomic profiling of DNA methylation in paired prostate cancer versus adjacent benign tissue. *Prostate* 2015; 75:1941-50.
- Giampuzzi M, Oleggini R, and Di DA. Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1647: 245-51.
- Gilad GM, Kagan HM, and Gilad VH. Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 2005; 376: 210-14.
- Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994; 7: 85-90.
- Goncalves BF, Campos SG, Costa CF, Scarano WR, Goes RM, and Taboga SR. Key participants of the tumor microenvironment of the prostate: an approach of the structural dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal transition. *Acta Histochem* 2015; 117: 4-13.
- Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, Calin GA, Fassan M, Bassi P et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007; 25: 387-92.
- Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res* 2011; 71: 5346-56.
- Gregersen LH, Jacobsen AB, Frankel LB, Wen J, Krogh A, and Lund AH. MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells. *PLoS One* 2010; 5: e8836.
- Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S et al. An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 1686-98.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, and Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007; 27: 91-105.
- Gu J, Wang Y, and Wu X. MicroRNA in the pathogenesis and prognosis of esophageal cancer. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 1292-300.
- Guo LH, Li H, Wang F, Yu J, and He JS. The Tumor Suppressor Roles of miR-433 and miR-127 in Gastric Cancer. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 14171-84.
- Hagiwara H, Sato H, Ohde Y, Takano Y, Seki T, Ariga T et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine suppresses human renal carcinoma cell growth in a xenograft model via up-regulation of the connexin 32 gene. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1373-81.
- Hakimi AA, Ostrovnaya I, Reva B, Schultz N, Chen YB, Gonen M et al. Adverse outcomes in clear cell renal cell carcinoma with mutations of 3p21 epigenetic regulators BAP1 and SETD2: a report by MSKCC and the KIRC TCGA research network. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 3259-67.
- Hamalainen ER, Kemppainen R, Kuivaniemi H, Tromp G, Vaheri A, Pihlajaniemi T et al. Quantitative polymerase chain reaction of lysyl oxidase mRNA in malignantly transformed human cell lines demonstrates that their low lysyl oxidase activity is due to low quantities of its mRNA and low levels of transcription of the respective gene. *J Biol Chem* 1995; 270: 21590-93.
- Han H, Cortez CC, Yang X, Nichols PW, Jones PA, and Liang G. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum Mol Genet* 2011a; 20: 4299-310.
- Han SX, Zhu Q, Ma JL, Zhao J, Huang C, Jia X et al. Lowered HGK expression inhibits cell invasion and adhesion in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4541-48.
- Han Y, Chen J, Zhao X, Liang C, Wang Y, Sun L et al. MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PLoS One* 2011b; 6: e18286.
- Han Z, Zhang Y, Yang Q, Liu B, Wu J, Zhang Y et al. miR-497 and miR-34a retard lung cancer growth by co-inhibiting cyclin E1 (CCNE1). *Oncotarget* 2015; 6: 13149-63.

- Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
- Hao JM, Chen JZ, Sui HM, Si-Ma XQ, Li GQ, Liu C et al. A five-gene signature as a potential predictor of metastasis and survival in colorectal cancer. *J Pathol* 2010; 220: 475-89.
- Harada K, Baba Y, Ishimoto T, Kosumi K, Tokunaga R, Izumi D et al. Suppressor microRNA-145 Is Epigenetically Regulated by Promoter Hypermethylation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 2015; 35: 4617-24.
- Harada K, Miyake H, Kusuda Y, and Fujisawa M. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: impact on prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int* 2012; 110: e1131-e1137.
- Harb-de la Rosa A, Acker M, Kumar RA, and Manoharan M. Epigenetics application in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *Can J Urol* 2015a; 22: 7947-51.
- Harb-de la Rosa A, Acker M, Swain S, and Manoharan M. The role of epigenetics in kidney malignancies. *Cent European J Urol* 2015b; 68: 157-64.
- Hatabe S, Kimura H, Arai T, Kato H, Hayashi H, Nagai T et al. Overexpression of heparan sulfate 6--sulfotransferase-2 in colorectal cancer. *Mol Clin Oncol* 2013; 1: 845-50.
- Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, Posorski N, Steiner T, Wunderlich H et al. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol* 2011; 29: 367-73.
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9700-04.
- Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007; 117: 3810-20.
- Hornstra IK, Birge S, Starcher B, Bailey AJ, Mecham RP, and Shapiro SD. Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem* 2003; 278: 14387-93.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute.
- Hsu T. Complex cellular functions of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene: insights from model organisms. *Oncogene* 2012; 31: 2247-57.
- Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut* 2013; 62: 1315-26.
- Hutvagner G and Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-60.
- International Agency for Research on Cancer. <http://www.iarc.fr/>. 2014.
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 2009; 41: 178-86.
- Jansen MK and Csiszar K. Intracellular localization of the matrix enzyme lysyl oxidase in polarized epithelial cells. *Matrix Biol* 2007; 26: 136-39.
- Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, and Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 5394-403.
- Jonasch E, Futreal PA, Davis IJ, Bailey ST, Kim WY, Brugarolas J et al. State of the science: an update on renal cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 2012; 10: 859-80.
- Jonasch E, Gao J, and Rathmell WK. Renal cell carcinoma. *BMJ* 2014; 349: g4797.
- Josson S, Sung SY, Lao K, Chung LW, and Johnstone PA. Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines. *Prostate* 2008; 68: 1599-606.

- Jung M, Mollenkopf HJ, Grimm C, Wagner I, Albrecht M, Waller T et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 3918-28.
- Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G et al. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 47.
- Jung M, Schaefer A, Steiner I, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A et al. Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin Chem* 2010; 56: 998-1006.
- Kagan HM. Lysyl oxidase: mechanism, regulation and relationship to liver fibrosis. *Pathol Res Pract* 1994; 190: 910-19.
- Kagan HM and Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 2003; 88: 660-72.
- Kagan HM, Raghavan J, and Hollander W. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arteriosclerosis* 1981; 1: 287-91.
- Kagan HM, Williams MA, Calaman SD, and Berkowitz EM. Histone H1 is a substrate for lysyl oxidase and contains endogenous sodium borotritide-reducible residues. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 115: 186-92.
- Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M et al. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res* 2004; 64: 6410-15.
- Kano M, Seki N, Kikkawa N, Fujimura L, Hoshino I, Akutsu Y et al. miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 127: 2804-14.
- Kaplan RN, Psaila B, and Lyden D. Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 2006a; 25: 521-29.
- Kaplan RN, Rafii S, and Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 2006b; 66: 11089-93.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-27.
- Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 2005; 96: 111-15.
- Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Kollermann J, Krause H, Schrader M et al. Expression parameters of the inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 in renal cell carcinomas and their prognostic relevance. *Int J Cancer* 2007; 120: 1081-86.
- Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 2004; 116: 259-72.
- Kim Y, Choi JW, Lee JH, and Kim YS. Expression of lactate/H(+) symporters MCT1 and MCT4 and their chaperone CD147 predicts tumor progression in clear cell renal cell carcinoma: immunohistochemical and The Cancer Genome Atlas data analyses. *Hum Pathol* 2015; 46: 104-12.
- Kim YK, Yeo J, Kim B, Ha M, and Kim VN. Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells. *Mol Cell* 2012; 46: 893-95.
- Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sullivan CM, Edwards EM et al. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res* 2002; 62: 4478-83.
- Kluger HM, Siddiqui SF, Angeletti C, Sznol M, Kelly WK, Molinaro AM et al. Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumor cells and endothelial cells. *Lab Invest* 2008; 88: 962-72.
- Kothapalli D, Liu SL, Bae YH, Monslow J, Xu T, Hawthorne EA et al. Cardiovascular protection by ApoE and ApoE-HDL linked to suppression of ECM gene expression and arterial stiffening. *Cell Rep* 2012; 2: 1259-71.
- Kumar MS, Pester RE, Chen CY, Lane K, Chin C, Lu J et al. Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev* 2009; 23: 2700-04.

- Kurban G, Hudon V, Duplan E, Ohh M, and Pause A. Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis. *Cancer Res* 2006; 66: 1313-19.
- Laber DA. Risk factors, classification, and staging of renal cell cancer. *Med Oncol* 2006; 23: 443-54.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, and Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-58.
- Lambertz I, Nittner D, Mestdagh P, Denecker G, Vandesompele J, Dyer MA et al. Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death Differ* 2010; 17: 633-41.
- Lamouille S, Xu J, and Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 178-96.
- Lau R and Pratt MA. The opposing roles of cellular inhibitor of apoptosis proteins in cancer. *ISRN Oncol* 2012; 2012: 928120.
- LeClaire LL, Rana M, Baumgartner M, and Barber DL. The Nck-interacting kinase NIK increases Arp2/3 complex activity by phosphorylating the Arp2 subunit. *J Cell Biol* 2015; 208: 161-70.
- Lee RC, Feinbaum RL, and Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-19.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, and Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21: 4663-70.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-60.
- Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002; 18: 1427-31.
- Li W, Nellaiappan K, Strassmaier T, Graham L, Thomas KM, and Kagan HM. Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12817-22.
- Li W, Nugent MA, Zhao Y, Chau AN, Li SJ, Chou IN et al. Lysyl oxidase oxidizes basic fibroblast growth factor and inactivates its mitogenic potential. *J Cell Biochem* 2003; 88: 152-64.
- Liang JJ, Wang H, Rashid A, Tan TH, Hwang RF, Hamilton SR et al. Expression of MAP4K4 is associated with worse prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7043-49.
- Liep J, Rabien A, and Jung K. Feedback networks between microRNAs and epigenetic modifications in urological tumors. *Epigenetics* 2012; 7: 315-25.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-73.
- Liu AW, Cai J, Zhao XL, Jiang TH, He TF, Fu HQ et al. ShRNA-targeted MAP4K4 inhibits hepatocellular carcinoma growth. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 710-20.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, and Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 719-23.
- Liu W, Liu Y, Liu H, Zhang W, An H, and Xu J. Snail predicts recurrence and survival of patients with localized clear cell renal cell carcinoma after surgical resection. *Urol Oncol* 2015a; 33: 69-10.
- Liu WT, Jing YY, Yu GF, Han ZP, Yu DD, Fan QM et al. Toll like receptor 4 facilitates invasion and migration as a cancer stem cell marker in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2015b; 358: 136-43.
- Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 2004; 36: 178-82.
- Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M et al. EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update. *Eur Urol* 2015.
- Loftus JC, Yang Z, Kloss J, Dhruv H, Tran NL, and Riggs DL. A Novel Interaction between Pyk2 and MAP4K4 Is Integrated with Glioma Cell Migration. *J Signal Transduct* 2013; 2013: 956580.

- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-38.
- Lu R, Ji Z, Li X, Zhai Q, Zhao C, Jiang Z et al. miR-145 functions as tumor suppressor and targets two oncogenes, ANGPT2 and NEDD9, in renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014; 140: 387-97.
- Lucero HA and Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2304-16.
- Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13556-61.
- Luo D, Wilson JM, Harvel N, Liu J, Pei L, Huang S et al. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. *J Transl Med* 2013; 11: 57.
- Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D et al. miR-9, a MYC/MYCIN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 247-56.
- Ma M and Baumgartner M. Intracellular *Theileria annulata* promote invasive cell motility through kinase regulation of the host actin cytoskeleton. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004003.
- Macher-Goeppinger S, Aulmann S, Tagscherer KE, Wagener N, Haferkamp A, Penzel R et al. Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors in renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 650-59.
- Mack KD, Von GM, Lin M, Venegas M, Barnhart J, Lu Y et al. Functional identification of kinases essential for T-cell activation through a genetic suppression screen. *Immunol Lett* 2005; 96: 129-45.
- Maki JM, Rasanen J, Tikkanen H, Sormunen R, Makikallio K, Kivirikko KI et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation* 2002; 106: 2503-09.
- Malentacchi F, Pazzagli M, Simi L, Orlando C, Wyrich R, Gunther K et al. SPIDIA-RNA: second external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *PLoS One* 2014; 9: e112293.
- Marx A, Kahan T, and Simon I. Integrative analysis of methylome and transcriptome reveals the importance of unmethylated CpGs in non-CpG island gene activation. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 785731.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271-75.
- Mayorca-Guiliani A and Erler JT. The potential for targeting extracellular LOX proteins in human malignancy. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 1729-35.
- McAllister SS and Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 2014; 16: 717-27.
- McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, and Algeciras-Schimmich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 2011; 57: 833-40.
- Mello ML, Contente S, Vidal BC, Planding W, and Schenck U. Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis. *Exp Cell Res* 1995; 220: 374-82.
- Mendell JT and Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012; 148: 1172-87.
- Merino MJ, Torres-Cabala C, Pinto P, and Linehan WM. The morphologic spectrum of kidney tumors in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC) syndrome. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 1578-85.
- Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 2641-50.
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, and James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-91.
- Mihaly Z, Sztupinszki Z, Surowiak P, and Gyorffy B. A comprehensive overview of targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12: 857-72.

- Mikami S, Oya M, Mizuno R, Kosaka T, Katsube K, and Okada Y. Invasion and metastasis of renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol* 2014; 47: 63-67.
- Min C, Kirsch KH, Zhao Y, Jeay S, Palamakumbura AH, Trackman PC et al. The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 1105-12.
- Min W, Wang B, Li J, Han J, Zhao Y, Su W et al. The expression and significance of five types of miRNAs in breast cancer. *Med Sci Monit Basic Res* 2014; 20: 97-104.
- Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006; 126: 1203-17.
- miRBase. www.mirbase.org 2014; Release 21.
- Molnar J, Fong KS, He QP, Hayashi K, Kim Y, Fong SF et al. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1647: 220-24.
- Molnar J, Ujfaludi Z, Fong SF, Bollinger JA, Waro G, Fogelgren B et al. Drosophila lysyl oxidases Dmlox1-1 and Dmlox1-2 are differentially expressed and the active DmLOXL-1 influences gene expression and development. *J Biol Chem* 2005; 280: 22977-85.
- Mongroo PS and Rustgi AK. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 219-22.
- Monsalve DM, Merced T, Fernandez IF, Blanco S, Vazquez-Cedeira M, and Lazo PA. Human VRK2 modulates apoptosis by interaction with Bcl-xL and regulation of BAX gene expression. *Cell Death Dis* 2013; 4: e513.
- Morris MR and Maher ER. Epigenetics of renal cell carcinoma: the path towards new diagnostics and therapeutics. *Genome Med* 2010; 2: 59.
- Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y, Tanigawa M, Yoshimoto T, Narimatsu T et al. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. *J Pathol* 2008; 216: 418-27.
- Nantajit D, Lin D, and Li JJ. The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141: 1697-713.
- Naqvi AR, Islam MN, Choudhury NR, and Haq QM. The fascinating world of RNA interference. *Int J Biol Sci* 2009; 5: 97-117.
- Narayanan AS, Siegel RC, and Martin GR. On the inhibition of lysyl oxidase by -aminopropionitrile. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 46: 745-51.
- Navai N and Wood CG. Environmental and modifiable risk factors in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2012; 30: 220-24.
- Nellaiappan K, Risitano A, Liu G, Nicklas G, and Kagan HM. Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J Cell Biochem* 2000; 79: 576-82.
- Neves R, Scheel C, Weinhold S, Honisch E, Iwaniuk KM, Trompeter HI et al. Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells. *BMC Res Notes* 2010; 3: 219.
- Nissan X, Denis JA, Saidani M, Lemaitre G, Peschanski M, and Baldeschi C. miR-203 modulates epithelial differentiation of human embryonic stem cells towards epidermal stratification. *Dev Biol* 2011; 356: 506-15.
- Novy M, Pohn R, Andorfer P, Novy-Weiland T, Galos B, Schwarzmayr L et al. EAPP, a novel E2F binding protein that modulates E2F-dependent transcription. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 2181-90.
- Nozawa M, Miura S, and Nei M. Origins and evolution of microRNA genes in Drosophila species. *Genome Biol Evol* 2010; 2: 180-89.
- Osawa T, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Kitayama K, Kawamoto T et al. Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer* 2013; 109: 2237-47.

- Ostenfeld MS, Bramsen JB, Lamy P, Villadsen SB, Fristrup N, Sorensen KD et al. miR-145 induces caspase-dependent and -independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in Ta bladder tumors. *Oncogene* 2010; 29: 1073-84.
- Ozen M, Karatas OF, Gulluoglu S, Bayrak OF, Sevli S, Guzel E et al. Overexpression of miR-145-5p inhibits proliferation of prostate cancer cells and reduces SOX2 expression. *Cancer Invest* 2015; 33: 251-58.
- Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 2008; 22: 3172-83.
- Palamakumbura AH, Jeay S, Guo Y, Pischon N, Sommer P, Sonenshein GE et al. The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 40593-600.
- Pape H, Klinke R, and Silbernagel S. *Physiologie*. Thieme Verlag KG 2010; 329-39.
- Parsons SJ and Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004; 23: 7906-09.
- Pasquinelli AE, Hunter S, and Bracht J. MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15: 200-05.
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 2005; 8: 241-54.
- Patil PA and Magi-Galluzzi C. MicroRNA in prostate cancer: Practical aspects. *Histol Histopathol* 2015; 30: 1379-96.
- Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF et al. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res* 2005; 65: 11429-36.
- Payne SL, Hendrix MJ, and Kirschmann DA. Lysyl oxidase regulates actin filament formation through the p130(Cas)/Crk/DOCK180 signaling complex. *J Cell Biochem* 2006; 98: 827-37.
- Payne SL, Hendrix MJ, and Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem* 2007; 101: 1338-54.
- Pazzagli M, Malentacchi F, Simi L, Orlando C, Wyrich R, Gunther K et al. SPIDIA-RNA: first external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *Methods* 2013; 59: 20-31.
- Perryman L and Erler JT. Lysyl oxidase in cancer research. *Future Oncol* 2014; 10: 1709-17.
- Pfaffenroth EC and Linehan WM. Genetic basis for kidney cancer: opportunity for disease-specific approaches to therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8: 779-90.
- Pickup MW, Laklai H, Acerbi I, Owens P, Gorska AE, Chytil A et al. Stromally derived lysyl oxidase promotes metastasis of transforming growth factor-beta-deficient mouse mammary carcinomas. *Cancer Res* 2013; 73: 5336-46.
- Playford MP and Schaller MD. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 2004; 23: 7928-46.
- Qiu MH, Qian YM, Zhao XL, Wang SM, Feng XJ, Chen XF et al. Expression and prognostic significance of MAP4K4 in lung adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 2012; 208: 541-48.
- Ralla B, Stephan C, Meller S, Dietrich D, Kristiansen G, and Jung K. Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014; 51: 200-31.
- Ramakrishnan S, Ellis L, and Pili R. Histone modifications: implications in renal cell carcinoma. *Epigenomics* 2013a; 5: 453-62.
- Ramakrishnan S and Pili R. Histone deacetylase inhibitors and epigenetic modifications as a novel strategy in renal cell carcinoma. *Cancer J* 2013b; 19: 333-40.
- Rani SB, Rathod SS, Karthik S, Kaur N, Muzumdar D, and Shiras AS. MiR-145 functions as a tumor-suppressive RNA by targeting Sox9 and adducin 3 in human glioma cells. *Neuro Oncol* 2013; 15: 1302-16.

- Ratert N, Meyer HA, Jung M, Lioudmer P, Mollenkopf HJ, Wagner I et al. miRNA profiling identifies candidate mirnas for bladder cancer diagnosis and clinical outcome. *J Mol Diagn* 2013; 15: 695-705.
- Rathmell WK and Chen S. VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8: 63-73.
- Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med* 2012; 10: 55.
- Redshaw N, Wilkes T, Whale A, Cowen S, Huggett J, and Foy CA. A comparison of miRNA isolation and RT-qPCR technologies and their effects on quantification accuracy and repeatability. *Biotechniques* 2013; 54: 155-64.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-06.
- Ricketts CJ, Morris MR, Gentle D, Shuib S, Brown M, Clarke N et al. Methylation profiling and evaluation of demethylating therapy in renal cell carcinoma. *Clin Epigenetics* 2013; 5: 16.
- Robert Koch-Institut. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin 2010.
- Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2009/2010. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). 2013; 9. Ausgabe.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, and Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-10.
- Rost T, Pyritz V, Rathcke IO, Gorogh T, Dunne AA, and Werner JA. Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 2003; 23: 1565-73.
- Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3207-12.
- Saito Y and Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* 2006a; 5: 2220-22.
- Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006b; 9: 435-43.
- Sandoval J, Diaz-Lagares A, Salgado R, Servitje O, Climent F, Ortiz-Romero PL et al. MicroRNA expression profiling and DNA methylation signature for deregulated microRNA in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 1128-37.
- Santhana KK, Tripolitsioti D, Ma M, Grahlert J, Egli KB, Fiaschetti G et al. The Ser/Thr kinase MAP4K4 drives c-Met-induced motility and invasiveness in a cell-based model of SHH medulloblastoma. *Springerplus* 2015; 4: 19.
- Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL et al. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* 2003; 63: 3735-42.
- Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2013; 45: 860-67.
- Savarimuthu Francis SM, Davidson MR, Tan ME, Wright CM, Clarke BE, Duhig EE et al. MicroRNA-34c is associated with emphysema severity and modulates SERPINE1 expression. *BMC Genomics* 2014; 15: 88.
- Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 2010a; 126: 1166-76.
- Schaefer A, Stephan C, Busch J, Yousef GM, and Jung K. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of microRNAs in urologic tumors. *Nat Rev Urol* 2010b; 7: 286-97.
- Schietke R, Warnecke C, Wacker I, Schodel J, Mole DR, Campean V et al. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J Biol Chem* 2010; 285: 6658-69.

- Schiffgen M, Schmidt DH, von RA, Muller SC, and Ellinger J. Epigenetic regulation of microRNA expression in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 436: 79-84.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 3.
- Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, Tze S et al. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol* 2009; 174: 1619-28.
- Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010; 29: 625-34.
- Shen H, Shen J, Wang L, Shi Z, Wang M, Jiang BH et al. Low miR-145 expression level is associated with poor pathological differentiation and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2015; 69: 301-05.
- Shi L, Wang Z, Sun G, Wan Y, Guo J, and Fu X. miR-145 inhibits migration and invasion of glioma stem cells by targeting ABCG2. *Neuromolecular Med* 2014; 16: 517-28.
- Shih W and Yamada S. N-cadherin as a key regulator of collective cell migration in a 3D environment. *Cell Adh Migr* 2012; 6: 513-17.
- Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A et al. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *Eur Urol* 2015; 67: 85-97.
- Silva-Santos RM, Costa-Pinheiro P, Luis A, Antunes L, Lobo F, Oliveira J et al. MicroRNA profile: a promising ancillary tool for accurate renal cell tumour diagnosis. *Br J Cancer* 2013; 109: 2646-53.
- Singer K, Kastenberger M, Gottfried E, Hammerschmied CG, Buttner M, Aigner M et al. Warburg phenotype in renal cell carcinoma: high expression of glucose-transporter 1 (GLUT-1) correlates with low CD8(+) T-cell infiltration in the tumor. *Int J Cancer* 2011; 128: 2085-95.
- Slaby O, Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L et al. Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 707-16.
- Sobin LH and Compton CC. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 2010; 116: 5336-39.
- Song K, Li Q, Peng YB, Li J, Ding K, Chen LJ et al. Silencing of hHES6 inhibits progression of pancreatic cancer through inhibition of Notch signalling. *Biochem J* 2011; 436: 271-82.
- Song WH, Feng XJ, Gong SJ, Chen JM, Wang SM, Xing DJ et al. microRNA-622 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2015.
- Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 1469-89.
- Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003; 200: 448-64.
- Stassar MJ, Devitt G, Brosius M, Rinnab L, Prang J, Schradin T et al. Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2001; 85: 1372-82.
- Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006; 12: 895-904.
- Su YC, Treisman JE, and Skolnik EY. The Drosophila Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Dev* 1998; 12: 2371-80.
- Suh SO, Chen Y, Zaman MS, Hirata H, Yamamura S, Shahryari V et al. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis* 2011; 32: 772-78.
- Sun J, Gao B, Zhou M, Wang ZZ, Zhang F, Deng JE et al. Comparative genomic analysis reveals evolutionary characteristics and patterns of microRNA clusters in vertebrates. *Gene* 2013; 512: 383-91.

- Suzuki Y, Tamura G, Maesawa C, Fujioka T, Kubo T, and Satodate R. Analysis of genetic alterations in renal cell carcinoma using the polymerase chain reaction. *Virchows Arch* 1994; 425: 335.
- Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Haab BB et al. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9754-59.
- Tan W, Gu J, Huang M, Wu X, and Hildebrandt MA. Epigenetic analysis of microRNA genes in tumors from surgically resected lung cancer patients and association with survival. *Mol Carcinog* 2015; 54 Suppl 1: E45-E51.
- Tanaka T, Yamaguchi J, Shoji K, and Nangaku M. Anthracycline inhibits recruitment of hypoxia-inducible transcription factors and suppresses tumor cell migration and cardiac angiogenic response in the host. *J Biol Chem* 2012; 287: 34866-82.
- Tang K and Xu H. Prognostic value of meta-signature miRNAs in renal cell carcinoma: an integrated miRNA expression profiling analysis. *Sci Rep* 2015; 5: 10272.
- Tang W, Qin J, Tang J, Zhang H, Zhou Z, Li B et al. Aberrant reduction of MiR-141 increased CD47/CUL3 in Hirschsprung's disease. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32: 1655-67.
- Teixeira AL, Ferreira M, Silva J, Gomes M, Dias F, Santos JI et al. Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients. *Tumour Biol* 2014; 35: 4057-66.
- Tejero R, Navarro A, Campayo M, Vinolas N, Marrades RM, Cordeiro A et al. miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma. *PLoS One* 2014; 9: e101899.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. 2013; 499: 43-49.
- Thomas JS and Kabbinavar F. Metastatic clear cell renal cell carcinoma: A review of current therapies and novel immunotherapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;
- Tolle A, Ratert N, and Jung K. miRNA panels as biomarkers for bladder cancer. *Biomark Med* 2014; 8: 733-46.
- Tsai KW, Wu CW, Hu LY, Li SC, Liao YL, Lai CH et al. Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. *Int J Cancer* 2011; 129: 2600-10.
- Tsang FH, Au SL, Wei L, Fan DN, Lee JM, Wong CC et al. MicroRNA-142-3p and microRNA-142-5p are downregulated in hepatocellular carcinoma and exhibit synergistic effects on cell motility. *Front Med* 2015; 9: 331-43.
- Tun HW, Marlow LA, von Roemeling CA, Cooper SJ, Kreinest P, Wu K et al. Pathway signature and cellular differentiation in clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One* 2010; 5: e10696.
- Uhlmann S, Zhang JD, Schwager A, Mannsperger H, Riazalhosseini Y, Burmester S et al. miR-200bc/429 cluster targets PLCgamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene* 2010; 29: 4297-306.
- Vadasz Z and Rimar D. New potential biomarkers for disease activity and fibrosis in systemic sclerosis. *Isr Med Assoc J* 2014; 16: 629-30.
- van der Mijn JC, Mier JW, Broxterman HJ, and Verheul HM. Predictive biomarkers in renal cell cancer: insights in drug resistance mechanisms. *Drug Resist Updat* 2014; 17: 77-88.
- Vaupel P and Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 225-39.
- Verine J, Pluvinage A, Bousquet G, Lehmann-Che J, de BC, Soufir N et al. Hereditary renal cancer syndromes: an update of a systematic review. *Eur Urol* 2010; 58: 701-10.
- Viana NI, Reis ST, Dip NG, Morais DR, Moura CM, Silva IA et al. MicroRNAs 143 and 145 may be involved in benign prostatic hyperplasia pathogenesis through regulation of target genes and proteins. *Int J Biol Markers* 2014; 29: e246-e252.
- Villadsen SB, Bramsen JB, Ostenfeld MS, Wiklund ED, Fristrup N, Gao S et al. The miR-143/-145 cluster regulates plasminogen activator inhibitor-1 in bladder cancer. *Br J Cancer* 2012; 106: 366-74.

- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-61.
- Vrba L, Jensen TJ, Garbe JC, Heimark RL, Cress AE, Dickinson S et al. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PLoS One* 2010; 5: e8697.
- Waaaijer CJ, de Andrea CE, Hamilton A, van Oosterwijk JG, Stringer SE, and Bovee JV. Cartilage tumour progression is characterized by an increased expression of heparan sulphate 6O-sulphation-modifying enzymes. *Virchows Arch* 2012; 461: 475-81.
- Wakasaki H and Ooshima A. Immunohistochemical localization of lysyl oxidase with monoclonal antibodies. *Lab Invest* 1990; 63: 377-84.
- Waltering KK, Porkka KP, Jalava SE, Urbanucci A, Kohonen PJ, Latonen LM et al. Androgen regulation of micro-RNAs in prostate cancer. *Prostate* 2011; 71: 604-14.
- Wang B, Koh P, Winbanks C, Coughlan MT, McClelland A, Watson A et al. miR-200a Prevents renal fibrogenesis through repression of TGF-beta2 expression. *Diabetes* 2011; 60: 280-87.
- Wang B, Shen ZL, Gao ZD, Zhao G, Wang CY, Yang Y et al. MiR-194, commonly repressed in colorectal cancer, suppresses tumor growth by regulating the MAP4K4/c-Jun/MDM2 signaling pathway. *Cell Cycle* 2015; 14: 1046-58.
- Wang E. MicroRNA, the putative molecular control for mid-life decline. *Ageing Res Rev* 2007; 6: 1-11.
- Watson AK and Witwer KW. Do platform-specific factors explain microRNA profiling disparities? *Clin Chem* 2012; 58: 472-74.
- Winter J and Diederichs S. MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol* 2011; 676: 3-22.
- Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J, Wei H, Chaturvedi P et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 16369-74.
- Wotschovsky Z, Busch J, Jung M, Kempkensteffen C, Weikert S, Schaser KD et al. Diagnostic and prognostic potential of differentially expressed miRNAs between metastatic and non-metastatic renal cell carcinoma at the time of nephrectomy. *Clin Chim Acta* 2013; 416: 5-10.
- Wotschovsky Z, Liep J, Meyer HA, Jung M, Wagner I, Disch AC et al. Identification of metastamirs as metastasis-associated microRNAs in clear cell renal cell carcinomas. *Int J Biol Sci* 2012; 8: 1363-74.
- Wotschovsky Z, Meyer HA, Jung M, Fendler A, Wagner I, Stephan C et al. Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases. *Anal Biochem* 2011; 417: 233-41.
- Woznick AR, Braddock AL, Dulai M, Seymour ML, Callahan RE, Welsh RJ et al. Lysyl oxidase expression in bronchogenic carcinoma. *Am J Surg* 2005; 189: 297-301.
- Wright JH, Wang X, Manning G, LaMere BJ, Le P, Zhu S et al. The STE20 kinase HGK is broadly expressed in human tumor cells and can modulate cellular transformation, invasion, and adhesion. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 2068-82.
- Wu A, Wu K, Li M, Bao L, Shen X, Li S et al. Upregulation of microRNA-492 induced by epigenetic drug treatment inhibits the malignant phenotype of clear cell renal cell carcinoma in vitro. *Mol Med Rep* 2015; 12: 1413-20.
- Xu F, He H, Huang W, Lin Y, Luo S, Du Q et al. Decreased expression of MicroRNA-200 family in human breast cancer is associated with lymph node metastasis. *Clin Transl Oncol* 2015a;
- Xu X, Wu X, Jiang Q, Sun Y, Liu H, Chen R et al. Downregulation of microRNA-1 and microRNA-145 contributes synergistically to the development of colon cancer. *Int J Mol Med* 2015b;
- Xue G, Ren Z, Chen Y, Zhu J, Du Y, Pan D et al. A feedback regulation between miR-145 and DNA methyltransferase 3b in prostate cancer cell and their responses to irradiation. *Cancer Lett* 2015; 361: 121-27.
- Xue Y, Wang X, Li Z, Gotoh N, Chapman D, and Skolnik EY. Mesodermal patterning defect in mice lacking the Ste20 NCK interacting kinase (NIK). *Development* 2001; 128: 1559-72.

- Yamasaki T, Seki N, Yoshino H, Itesako T, Hidaka H, Yamada Y et al. MicroRNA-218 inhibits cell migration and invasion in renal cell carcinoma through targeting caveolin-2 involved in focal adhesion pathway. *J Urol* 2013; 190: 1059-68.
- Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 295-305.
- Yang S, Gao Q, and Jiang W. Relationship between tumour angiogenesis and expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-A in human renal cell carcinoma. *J Int Med Res* 2015; 43: 110-17.
- Yang SD, Sun RC, Mu HJ, Xu ZQ, and Zhou ZY. The expression and clinical significance of TGF- β 1 and MMP2 in human renal clear cell carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2010; 18: 85-93.
- Yang Z, Tsuchiya H, Zhang Y, Hartnett ME, and Wang L. MicroRNA-433 inhibits liver cancer cell migration by repressing the protein expression and function of cAMP response element-binding protein. *J Biol Chem* 2013; 288: 28893-99.
- Yao Z, Zhou G, Wang XS, Brown A, Diener K, Gan H et al. A novel human STE20-related protein kinase, HGK, that specifically activates the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 2118-25.
- Ye Z, Shen N, Weng Y, Li K, Hu L, Liao H et al. Low miR-145 silenced by DNA methylation promotes NSCLC cell proliferation, migration and invasion by targeting mucin 1. *Cancer Biol Ther* 2015; 16: 1071-79.
- Yoshino H, Enokida H, Itesako T, Kojima S, Kinoshita T, Tatarano S et al. Tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster targets hexokinase-2 in renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 2013a; 104: 1567-74.
- Yoshino H, Enokida H, Itesako T, Tatarano S, Kinoshita T, Fuse M et al. Epithelial-mesenchymal transition-related microRNA-200s regulate molecular targets and pathways in renal cell carcinoma. *J Hum Genet* 2013b; 58: 508-16.
- Young AN, Amin MB, Moreno CS, Lim SD, Cohen C, Petros JA et al. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am J Pathol* 2001; 158: 1639-51.
- Yu F, Deng H, Yao H, Liu Q, Su F, and Song E. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene* 2010; 29: 4194-204.
- Yu G, Li H, Wang J, Gumireddy K, Li A, Yao W et al. miRNA-34a suppresses cell proliferation and metastasis by targeting CD44 in human renal carcinoma cells. *J Urol* 2014; 192: 1229-37.
- Yu H, Xu SS, Cheng QQ, He LM, and Li Z. [Expression and clinical significance of Toll-like receptors in human renal carcinoma cell 786-0 and normal renal cell HK-2]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2011; 91: 129-31.
- Yu XY, Zhang Z, Liu J, Zhan B, and Kong CZ. MicroRNA-141 is downregulated in human renal cell carcinoma and regulates cell survival by targeting CDC25B. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 349-54.
- Zaman MS, Chen Y, Deng G, Shahryari V, Suh SO, Saini S et al. The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br J Cancer* 2010; 103: 256-64.
- Zaravinos A. The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *J Oncol* 2015; 2015: 865816.
- Zhao G, Wang B, Liu Y, Zhang JG, Deng SC, Qin Q et al. miRNA-141, downregulated in pancreatic cancer, inhibits cell proliferation and invasion by directly targeting MAP4K4. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 2569-80.
- Zhou X, Wang Y, Shan B, Han J, Zhu H, Lv Y et al. The downregulation of miR-200c/141 promotes ZEB1/2 expression and gastric cancer progression. *Med Oncol* 2015; 32: 428.
- Zohn IE, Li Y, Skolnik EY, Anderson KV, Han J, and Niswander L. p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation. *Cell* 2006; 125: 957-69.
- Zubac DP, Wentzel-Larsen T, Seidal T, and Bostad L. Type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) and its impact on angiogenesis, progression and patient survival after radical nephrectomy. *BMC Urol* 2010; 10: 20.

6. Anhang

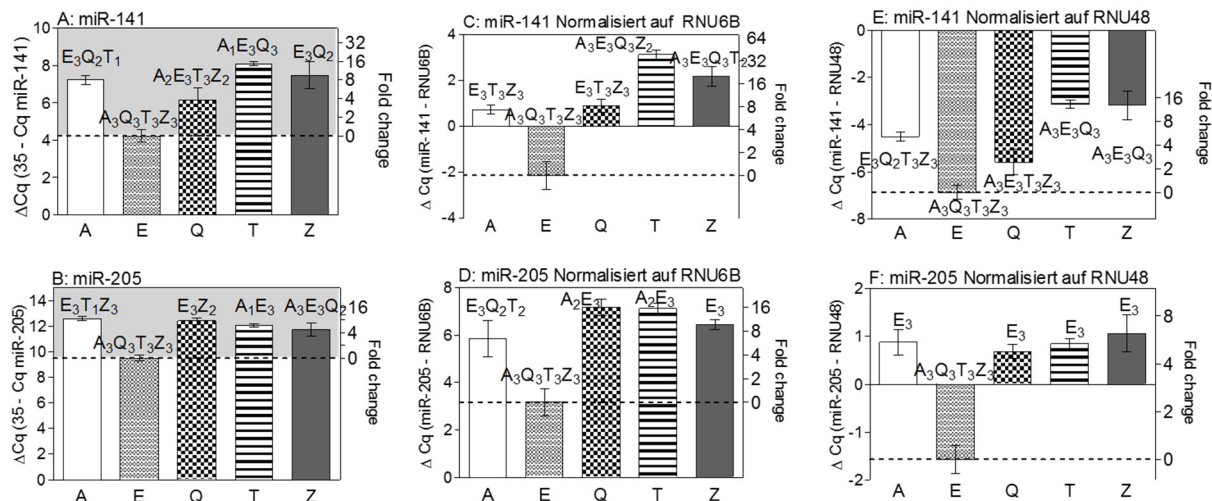
6.1. Abbildungen und Tabellen

Anhang 1. Oligonukleotide zur mRNA-Expressionsanalyse und Assay-Informationen.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	System	Tm
BIRC2	GGAGAAGAAAATGCTGACCCAC	AAAGCCCATTTCGAAGGCAGA	SYBR	59 °C
BIRC5	AAGGACCACCGCATCTCTACA	GCCAGCCTCGGCCAT	SYBR	63 °C
CDH2	GGAGACATTGGGGACTTCATTA	TCATAGTCAAACACTAACAGGGAGTC	UPL #22	60 °C
CDC42EP3	AGAGCCCATTTCAGGAGGC	TAATGTGACTCGCTCAGCCC	SYBR	59 °C
Cdh1	CCCGGGACAACGTTTATTAC	GCTGGCTCAAGTCAAAGTCC	SYBR	57 °C
EAPP	TTCCGGATGACTACGACCCC	AGCACATCCACTTCATCCTCAG	SYBR	57 °C
FRMD4A	AGCAAGGGGAAGATCATCAG	CGACTGCGAGCTATCTGATTCT	UPL #40	60 °C
ITGB3	AGCTCATTGTTGATGCTTATGG	AACTCTTCAGGGAGGTCACG	UPL #11	60 °C
LOXL1	TGCAGCCTGGGAACATACATC	TGCAGAAACGTAGCGACCTG	SYBR	61 °C
MAP2K4	GGCCAAAGTATAAAGAGCTTCTGA	CAGCGATATCAATCGACATACAT	UPL #33	60 °C
NRAS	AATACATGAGGACAGGCGAAG	GAGTCTTTTACTCGCTTAATCTGCTC	UPL #6	60 °C
NRP2	GGTATACCCGGAGAGGTGGT	TCTACCGTGGGCTTGGAGT	UPL #26	60 °C
SERPINE1	CAGCTGACAACAGGAGGAGA	CCCATGAGCTCCTTGTACAGAT	UPL #84	60 °C
SLC16A3	GAGTTTGGGATCGGCTACAG	CGGTTACGCACACACTG	UPL #58	60 °C
TGFB2	ATAGACATGCCGCCCTTCTT	GGCATCAAGGTACCCACAGA	SYBR	57 °C
TGFB1	AACGTTCTGTTCCGTGAG	CCAACCAGAGCTGAGTCCAA	SYBR	61 °C
TLR4	CCTGAGGCATTAGGCAGCTA	AGGCTCTGATATGCCCCATC	SYBR	57 °C
TMEM16F	CCATCATGCAAGGAATAGCA	TGTCCGACGTGAAAGCTATG	UPL #76	60 °C
TNFRSF10B	CAGAGCCAACAGGTGTCAAC	CCTTTTCAGCTTCTGCCGGTT	SYBR	61 °C
TNFSF4	GCTCCTGTGCTTCACCTACA	CCTCCTTTTGGGAAGTGAGGAT	SYBR	57 °C
VRK2	AAGTGGATAGAACGCAACAAC	CCTAGTCTTTCCATTACCATAAACTG	UPL #6	60 °C
ZEB2	CGATCCAGACCGCAATTAAC	TGCTGACTGCATGACCATC	SYBR	57 °C

Anhang 2. miRBase-Daten der übrigen microRNAs und Assay-ID des TaqMan® MicroRNA-Assays.

Name	Name miRBase 21	Accession # miRBase 21	Mature Sequence	Assay ID
miR-100	hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	000437
miR-101	hsa-miR-101-3p	MIMAT0000099	UACAGUACUGUGUAACUGAA	002253
miR-10b	hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	002218
miR-127	hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	000452
miR-130a	hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	CAGUGCAAUGUUAAGGGCAU	000454
miR-148a	hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	000470
miR-192	hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	000491
miR-194	hsa-miR-194-5p	MIMAT0000460	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	000493
miR-19b	hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	000396
miR-200c	hsa-miR-200c-3p	MIMAT0004150	UAAUACUGCCGGUAAUGAUGG	000505
miR-215	hsa-miR-215-5p	MIMAT0000272	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	000518
miR-26a	hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	000405
miR-29a	hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	UAGCACCAUCUGAAUCCGUUA	002112
miR-29b	hsa-miR-29b-3p	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAUCCAGUGUU	000413
miR-514	ptr-miR-514	MIMAT0005778	AUUGACACUUCUGUGAGUAG	001147



Anhang 3. Expression von microRNAs in RT112-Zellen in Abhängigkeit von der Isolierungstechnik.

Gesamt-RNA wurde aus Blasenzelllinien mit fünf unterschiedlichen Techniken isoliert, die auf der X-Achse gezeigt sind: Ambion (A), Exiqon (E), Qiagen (Q), Trizol (T) und Zymoresearch (Z). Die Expression von miRNAs und RNUs wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD, wobei in A und B nicht, in C und D auf RNU6B und in E und F auf RNU48 normalisiert wurde. Die Symbole über den Balken verdeutlichen die statistischen Unterschiede zu den anderen Methoden. Tiefgestellte Zahlen zeigen das Signifikanzniveau an. One-way ANOVA, korrigiert nach Holm-Sidak für multiple Vergleiche; 1 = $p < 0.05$; 2 = $p < 0.01$; 3 = $p < 0.001$.

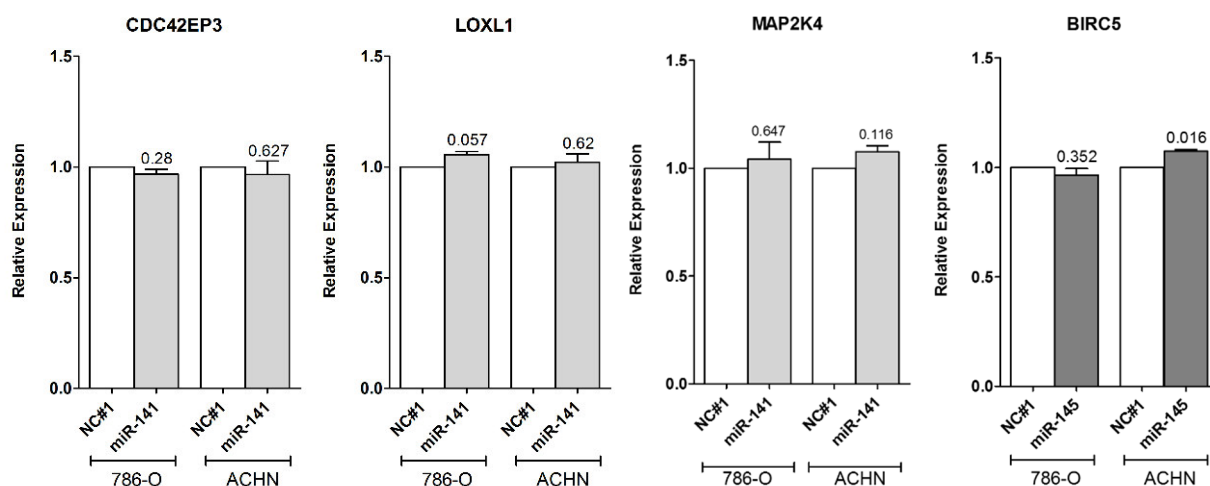
Anhang 4. Gemeinsame potenzielle Targets für miR-141 und miR-145.

Gen	RefseqID	Gen Name
ACP2	NM_001610	ACP2 acid phosphatase 2, lysosomal [Homo sapiens (human)]
ADAMTS8	NM_007037	ADAMTS8 ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8 [Homo sapiens (human)]
AHR	NM_001621	AHR aryl hydrocarbon receptor [Homo sapiens (human)]
AK2	NM_013411	AK2 adenylate kinase 2 [Homo sapiens (human)]
ALG2	NM_033087	ALG2 ALG2, alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase [Homo sapiens (human)]
ALS2	NM_020919	ALS2 amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) [Homo sapiens (human)]
APH1B	NM_031301	APH1B APH1B gamma secretase subunit [Homo sapiens (human)]
ARMC7	NM_024585	ARMC7 armadillo repeat containing 7 [Homo sapiens (human)]
ATXN1	NM_000332	ATXN1 ataxin 1 [Homo sapiens (human)]
ATXN7L1	NM_020725	ATXN7L1 ataxin 7-like 1 [Homo sapiens (human)]
C10orf11	NM_018017	C10orf118 chromosome 10 open reading frame 118 [Homo sapiens (human)]
C10orf47	NM_153256	PROSER2 proline and serine rich 2 [Homo sapiens (human)]
C14orf49	NM_152592	SYNE3 spectrin repeat containing, nuclear envelope family member 3 [Homo sapiens (human)]
C1QTNF5	NM_015645	C1QTNF5 C1q and tumor necrosis factor related protein 5 [Homo sapiens (human)]
C6orf114	NM_033069	GFOD1 glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1 [Homo sapiens (human)]
C9orf126	NM_173690	SCAI suppressor of cancer cell invasion [Homo sapiens (human)]
C9orf165	NM_198573	ENHO energy homeostasis associated [Homo sapiens (human)]
CCDC28A	NM_015439	CCDC28A coiled-coil domain containing 28A [Homo sapiens (human)]
CGNL1	NM_032866	CGNL1 cingulin-like 1 [Homo sapiens (human)]
CIAO1	NM_004804	CIAO1 cytosolic iron-sulfur assembly component 1 [Homo sapiens (human)]
DDHD1	NM_030637	DDHD1 DDHD domain containing 1 [Homo sapiens (human)]
DNHD1	NM_144666	DNHD1 dynein heavy chain domain 1 [Homo sapiens (human)]
DOK6	NM_152721	DOK6 docking protein 6 [Homo sapiens (human)]
DPH3	NM_001047434	DPH3 dipthamide biosynthesis 3 [Homo sapiens (human)]
DUSP6	NM_001946	DUSP6 dual specificity phosphatase 6 [Homo sapiens (human)]
EAPP	NM_018453	EAPP E2F-associated phosphoprotein [Homo sapiens (human)]
ELOVL2	NM_017770	ELOVL2 ELOVL fatty acid elongase 2 [Homo sapiens (human)]
EPN1	NM_001130071	EPN1 epsin 1 [Homo sapiens (human)]
FRMD4A	NM_018027	FRMD4A FERM domain containing 4A [Homo sapiens (human)]
FUS	NM_004960	FUS FUS RNA binding protein [Homo sapiens (human)]
GABARAP	NM_007285	GABARAPL2 GABA(A) receptor-associated protein-like 2 [Homo sapiens (human)]
GLG1	NM_012201	GLG1 golgi glycoprotein 1 [Homo sapiens (human)]
GLUL1	NM_016571	LGSN lensin, lens protein with glutamine synthetase domain [Homo sapiens (human)]

GOLM1	NM_016548	GOLM1 golgi membrane protein 1 [Homo sapiens (human)]
GPR137C	NM_001099652	GPR137C G protein-coupled receptor 137C [Homo sapiens (human)]
GRB10	NM_001001555	GRB10 growth factor receptor-bound protein 10 [Homo sapiens (human)]
GTF2H5	NM_207118	GTF2H5 general transcription factor IIH, polypeptide 5 [Homo sapiens (human)]
HDAC8	NM_018486	HDAC8 histone deacetylase 8 [Homo sapiens (human)]
HS6ST2	NM_001077188	HS6ST2 heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2 [Homo sapiens (human)]
HTATSF1	NM_014500	HTATSF1 HIV-1 Tat specific factor 1 [Homo sapiens (human)]
HTR2C	NM_000868	HTR2C 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C, G protein-coupled [Homo sapiens (human)]
IRS2	NM_003749	IRS2 insulin receptor substrate 2 [Homo sapiens (human)]
ITGB3	NM_000212	ITGB3 integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61) [Homo sapiens (human)]
KIAA1600	NM_020940	FAM160B1 family with sequence similarity 160, member B1 [Homo sapiens (human)]
KLF5	NM_001730	KLF5 Kruppel-like factor 5 (intestinal) [Homo sapiens (human)]
LMLN	NM_033029	LMLN leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family) [Homo sapiens (human)]
LOC44008	NM_001013698	SMCO3 single-pass membrane protein with coiled-coil domains 3 [Homo sapiens (human)]
LOX	NM_002317	LOX lysyl oxidase [Homo sapiens (human)]
LZIC	NM_032368	LZIC leucine zipper and CTNBP1 domain containing [Homo sapiens (human)]
MDFIC	NM_199072	MDFIC MyoD family inhibitor domain containing [Homo sapiens (human)]
MEGF11	NM_032445	MEGF11 multiple EGF-like-domains 11 [Homo sapiens (human)]
MGC3384	NM_175885	FAM181B family with sequence similarity 181, member B [Homo sapiens (human)]
MKL2	NM_014048	MKL2 MKL/myocardin-like 2 [Homo sapiens (human)]
MON2	NM_015026	MON2 MON2 homolog (S. cerevisiae) [Homo sapiens (human)]
MTMR15	NM_014967	FAN1 FANCD2/FANCI-associated nuclease 1 [Homo sapiens (human)]
MX1	NM_002462	MX1 myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) [Homo sapiens (human)]
NEK11	NM_024800	NEK11 NIMA-related kinase 11 [Homo sapiens (human)]
NPC1	NM_000271	NPC1 Niemann-Pick disease, type C1 [Homo sapiens (human)]
NRIP3	NM_020645	NRIP3 nuclear receptor interacting protein 3 [Homo sapiens (human)]
NRP2	NM_201266	NRP2 neuropilin 2 [Homo sapiens (human)]
OSBPL9	NM_148909	OSBPL9 oxysterol binding protein-like 9 [Homo sapiens (human)]
PAN2	NM_001127460	PAN2 PAN2 poly(A) specific ribonuclease subunit [Homo sapiens (human)]
PAPD4	NM_001114394	PAPD4 PAP associated domain containing 4 [Homo sapiens (human)]
PAQR9	NM_198504	PAQR9 progesterone and adipoQ receptor family member IX [Homo sapiens (human)]
PDCD4	NM_145341	PDCD4 programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor) [Homo sapiens (human)]
PLAG1	NM_002655	PLAG1 pleiomorphic adenoma gene 1 [Homo sapiens (human)]
PNPLA6	NM_006702	PNPLA6 patatin-like phospholipase domain containing 6 [Homo sapiens (human)]
PPM1L	NM_139245	PPM1L protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1L [Homo sapiens (human)]
PRTG	NM_173814	PRTG protogenin [Homo sapiens (human)]
PTGDR	NM_000953	PTGDR prostaglandin D2 receptor (DP) [Homo sapiens (human)]
RASAL2	NM_170692	RASAL2 RAS protein activator like 2 [Homo sapiens (human)]
RBPMS2	NM_194272	RBPMS2 RNA binding protein with multiple splicing 2 [Homo sapiens (human)]
RIMS1	NM_014989	RIMS1 regulating synaptic membrane exocytosis 1 [Homo sapiens (human)]
RPA2	NM_002946	RPA2 replication protein A2, 32kDa [Homo sapiens (human)]
SCARB2	NM_005506	SCARB2 scavenger receptor class B, member 2 [Homo sapiens (human)]
SCML4	NM_198081	SCML4 sex comb on midleg-like 4 (Drosophila) [Homo sapiens (human)]
SLC16A3	NM_001042422	SLC16A3 solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 3 [Homo sapiens (human)]
SLC25A31	NM_031291	SLC25A31 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide) [Homo sapiens (human)]
SNED1	NM_001080437	SNED1 sushi, nidogen and EGF-like domains 1 [Homo sapiens (human)]
SPG3A	NM_001127713	ATL1 atlastin GTPase 1 [Homo sapiens (human)]
SRP9	NM_001130440	SRP9 signal recognition particle 9kDa [Homo sapiens (human)]
SYPL2	NM_001040709	SYPL2 synaptophysin-like 2 [Homo sapiens (human)]
TARSL2	NM_152334	TARSL2 threonyl-tRNA synthetase-like 2 [Homo sapiens (human)]
TBC1D2B	NM_144572	TBC1D2B TBC1 domain family, member 2B [Homo sapiens (human)]
TGFB2	NM_003238	TGFB2 transforming growth factor, beta 2 [Homo sapiens (human)]
THEM2	NM_018473	ACOT13 acyl-CoA thioesterase 13 [Homo sapiens (human)]
TMEM16F	NM_001025356	ANO6 anoctamin 6 [Homo sapiens (human)]
TMEM42	NM_144638	TMEM42 transmembrane protein 42 [Homo sapiens (human)]
TNFSF4	NM_003326	TNFSF4 tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 [Homo sapiens (human)]
TRIM65	NM_173547	TRIM65 tripartite motif containing 65 [Homo sapiens (human)]
TTC14	NM_001042601	TTC14 tetratricopeptide repeat domain 14 [Homo sapiens (human)]
USP13	NM_003940	USP13 ubiquitin specific peptidase 13 (isopeptidase T-3) [Homo sapiens (human)]
VRK2	NM_001130483	VRK2 vaccinia related kinase 2 [Homo sapiens (human)]
WDFY3	NM_014991	WDFY3 WD repeat and FYVE domain containing 3 [Homo sapiens (human)]
WDR37	NM_014023	WDR37 WD repeat domain 37 [Homo sapiens (human)]

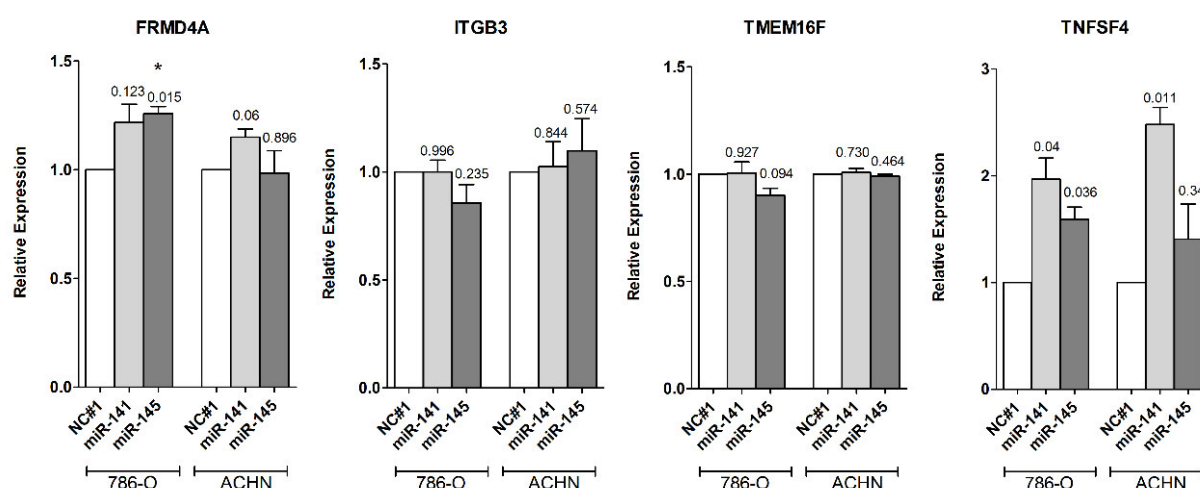
WDR43	NM_015131	WDR43 WD repeat domain 43 [Homo sapiens (human)]
YTHDF2	NM_016258	YTHDF2 YTH domain family, member 2 [Homo sapiens (human)]
ZNF24	NM_006965	ZNF24 zinc finger protein 24 [Homo sapiens (human)]
ZNF398	NM_020781	ZNF398 zinc finger protein 398 [Homo sapiens (human)]
ZNF830	NM_052857	ZNF830 zinc finger protein 830 [Homo sapiens (human)]

grau hinterlegt = in dieser Arbeit untersuchte Targets



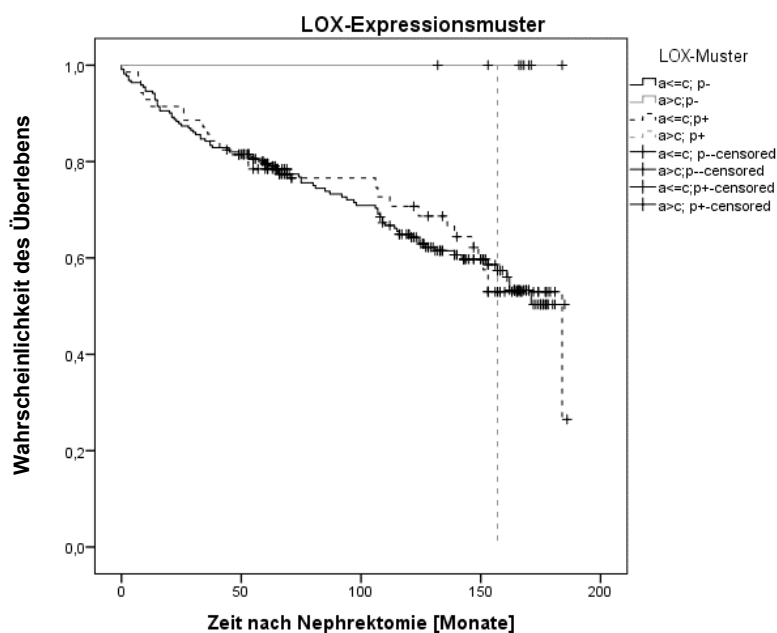
Anhang 5. Effekt der Überexpression von miR-141 oder miR-145 auf potenzielle Targets.

Die miR-141 oder miR-145 wurden für 48 h in den Nierentumorzelllinien 786-O und ACHN überexprimiert und anschließend der Effekt auf die potenziellen Targets auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR bestimmt. Angegeben ist die relative Expression im Vergleich zur Negativkontrolle (Mittelwert \pm SEM). NC#1 = Negativkontrolle; n = 3; t-test (two-tailed)



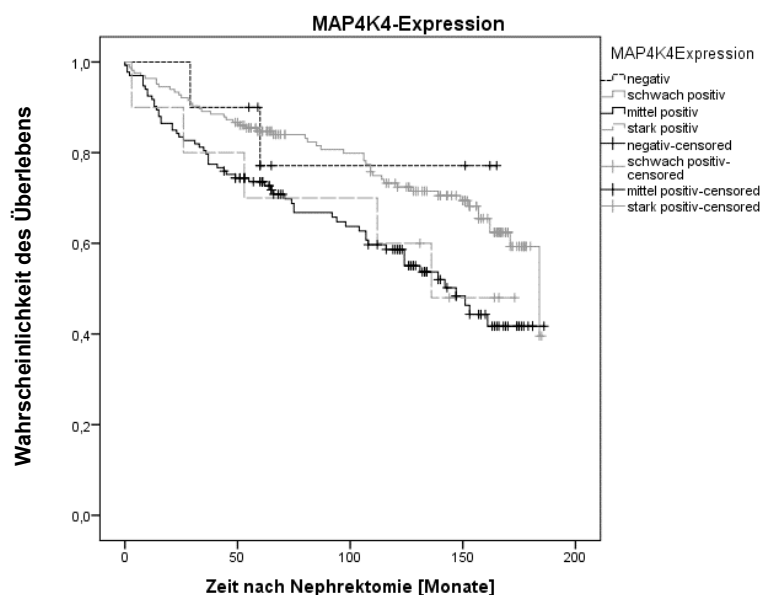
Anhang 6. Effekt der Überexpression von miR-141 oder miR-145 auf potenzielle gemeinsame Targets.

Die miR-141 oder miR-145 wurden für 48 h in den Nierentumorzelllinien 786-O und ACHN überexprimiert und anschließend der Effekt auf die potenziellen Targets auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR bestimmt. Angegeben ist die relative Expression im Vergleich zur Negativkontrolle (Mittelwert \pm SEM). NC#1 = Negativkontrolle; n = 3; t-test (two-tailed); *p < 0.05



Anhang 7. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit von ccRCC-Patienten in Abhängigkeit vom LOX-Expressionsmuster.

Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit nach Nephrektomie, zur Bewertung der prognostischen Relevanz des LOX-Expressionsmusters. LOX_a = apikale LOX-Expression; LOX_z = zytoplasmatische LOX-Expression; LOX_p = perinukleäre LOX-Expression.



Anhang 8. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit von ccRCC-Patienten in Abhängigkeit von der MAP4K4-Expression.

Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit nach Nephrektomie in Abhängigkeit der MAP4K4-Expressionsstärke. Die Intensität der MAP4K4-Expression wurde in 4 Gruppen eingeteilt: negativ, schwach positiv, moderat positiv und stark positiv.

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Aufbau und Funktion der Niere.	1
Abbildung 2. Krebsneuerkrankungen in Deutschland.	2
Abbildung 3. Epigenetische Regulation der Genexpression.	7
Abbildung 4. Hypoxie-Antwort durch VHL-Verlust im Nierenzellkarzinom.	8
Abbildung 5. Metastasierung des Nierenzellkarzinoms.	11
Abbildung 6. Biosyntheseweg der microRNAs.	13
Abbildung 7. Epigenetische Regulation von microRNAs bei der Tumorgenese.	16
Abbildung 8. Schema zur Bisulfidsequenzierung.	26
Abbildung 9. Schema zur <i>in-vitro</i> -Demethylierung.	31
Abbildung 10. RNA-Isolierung aus Zelllinien in Abhängigkeit von der Isolierungstechnik.	35
Abbildung 11. Expression von microRNAs in RT4-Zellen in Abhängigkeit von der Isolierungstechnik.	36
Abbildung 12. RNA-Isolierung aus Karzinomgewebe von Harnblase, Niere und Prostata in Abhängigkeit von der Isolierungstechnik.	36
Abbildung 13. Expression von microRNAs in Karzinomgewebe in Abhängigkeit von der Isolierungstechnik und Normalisierung.	37
Abbildung 14. Konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation durch epigenetische Inhibitoren.	40
Abbildung 15. Re-expression von microRNAs durch Hemmung epigenetischer Mechanismen in Zelllinien.	42
Abbildung 16. Expressionsniveau der epigenetisch herunterregulierten microRNAs.	43
Abbildung 17. CpG-Insel Vorhersage für Promotorregionen von miR-127, miR-141 und miR-145.	44
Abbildung 18. Methylierungsstatus der Promotorbereiche von miR-127, miR-141 und miR-145.	45
Abbildung 19. Etablierung der Transfektion mit synthetischen microRNAs.	46
Abbildung 20. Effekt von miR-141 und miR-145 auf die Proliferation von 786-O und ACHN-Zellen. ..	47
Abbildung 21. Effekt von miR-141 und miR-145 auf die Migration von 786-O-Zellen.	48
Abbildung 22. Effekt von miR-141 und miR-145 auf die Zellmigration und -invasion von 786-O-Zellen.	49
Abbildung 23. Effekt der Überexpression von miR-141 oder miR-145 auf potenzielle Targets.	53
Abbildung 24. Effekt der Überexpression von miR-141 und/oder miR-145 auf potenzielle gemeinsame Targets.	54
Abbildung 25. Expression der microRNAs miR-141 und miR-145 in Nierenzellkarzinomgewebe.	56
Abbildung 26. Expression der Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 in Nierenzellkarzinomgewebe.	58
Abbildung 27. Korrelation der Expression zwischen den Targets HS6ST2, LOX und MAP4K4 und den microRNAs miR-141 und miR-145 in Nierenzellkarzinomgewebe.	59
Abbildung 28. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit in Abhängigkeit von pathologischen Kenngrößen.	62
Abbildung 29. LOX-Expression im Gewebe von klarzelligen Nierenzellkarzinomen.	63
Abbildung 30. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der LOX-Expression. .	64
Abbildung 31. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit von ccRCC-Patienten in Abhängigkeit vom LOX-Expressionsmuster.	65
Abbildung 32. MAP4K4-Expression im Gewebe von klarzelligen Nierenzellkarzinomen.	67
Abbildung 33. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit von ccRCC-Patienten nach Nephrektomie in Abhängigkeit von der MAP4K4-Expression.	69

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Marker des epithelialen und mesenchymalen Phänotypen.....	9
Tabelle 2. Oligonukleotide zur mRNA-Expressionsanalyse und Assay-Informationen.	21
Tabelle 3. Oligonukleotide zur Bisulfidsequenzierung und Assay-Informationen.	21
Tabelle 4. miRBase-Daten der microRNAs und Assay-ID des TaqMan® MicroRNA-Assays.....	21
Tabelle 5. Sequenz der RNUs und Assay-Information von Applied Biosystems®.	22
Tabelle 6. Synthetische microRNAs.....	22
Tabelle 7. Übersicht der verwendeten humanen Zelllinien.	23
Tabelle 8. Liste der für die Analyse ausgewählten microRNAs.	39
Tabelle 9. Re-expression von microRNAs durch Hemmung epigenetischer Mechanismen in Zelllinien.	41
Tabelle 10. Effekt auf die potenziellen Targets durch Überexpression von miR-141 oder miR-145. ...	52
Tabelle 11. ROC-Analyse zur Vorhersage des diagnostischen Potenzials.	60
Tabelle 12. Klinische und histopathologische Charakterisierung der untersuchten Patienten (TMA). .	61
Tabelle 13. LOX-Expressionsmuster in ccRCC.	66
Tabelle 14. MAP4K4-Expression in ccRCC.	68
Tabelle 15. Univariate und multivariate Cox-Regression für ccRCC-Patienten ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen (n = 275).	70

6.4. Verzeichnis der Gene

Name	Beschreibung
TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor
ABCG2	ATP binding cassette subfamily G member 2
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17
ANGPT2	angiopoietin 2
BAP1	BRCA1 associated 1
BIRC2 (cIAP1)	baculoviral IAP repeat containing 2
CBFB	core-binding factor, beta subunit
CCND1	cyclin D1
CDC25B	cell division cycle 25B
CDH1	cadherin 1 (E-Cadherin)
CDH2	Cadherin 2 (N-Cadherin)
CLINT1	clathrin interactor 1
c-MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CTNNB1	catenin beta (β -Catenin)
CUL2	cullin 2
DICER	dicer 1, ribonuclease type III
DROSHA	drosha, ribonuclease type III
EAPP	E2F-associated phosphoprotein
EGFR	epidermal growth factor receptor
FGF2	fibroblast growth factor 2
FN1	fibronektin 1
FSCN1	fascin actin-bundling protein 1
GLUT1 (SLC2A1)	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
HIF	hypoxia inducible factor
HS6ST2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2
LOX	lysyl oxidase
MAP4K4 (HGK)	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4
MMP	matrix metalloproteinase
MUC1	mucin 1, cell surface associated
NAIP (BIRC1)	NLR family, apoptosis inhibitory protein
NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NRP2	neuropilin 2
Oct-4	OCT4 protein
PBRM1	polybromo 1
PDGF	platelet derived growth factor
PPP3CA	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme
RBX1	ring-box 1, E3 ubiquitin protein ligase (RING-Finger Protein)
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade, member 1
SETD2	SET domain-containing 2
SLC16A3 (MCT4)	solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 3
Snail	snail family zinc finger
SOX2	SRY-box 2
Src	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
TCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (Elongin C)
TCEB2	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (Elongin C)
TET2	tet methylcytosine dioxygenase 2
TGFB2	transforming growth factor beta
TGF α (TGFA)	transforming growth factor alpha
TGF- β (TGFB)	transforming growth factor beta
TLR4	toll-like receptor 4
TNFRSF10B	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TRIM2	tripartite motif containing 2
Twist	twist family bHLH transcription factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase
VRK2	vaccinia related kinase 2
Zeb1/2	Zinc finger E-box binding homeobox 2

6.5. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
3' UTR	3' untranslatierte Region
a	apikal
Ac	Acetylierung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AUC	Area under the curve
Aza	5-Aza 2'-deoxycytidin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
z	zytoplasmatisch
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom
ccRCC-M0	nicht-metastasierter RCC-Primärtumor
ccRCC-M1	metastasierter RCC-Primärtumor
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
ISUP	International Society of Urological Pathology
kb	Kilobasen
LOH	loss of heterozygosity
M	Fernmetastase
Meth	Methylierung
miRISC	MicroRNA induced silencing complex
miRNA	microRNA
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	Messenger RNA
N	Lymphknotenmetastase
n	Anzahl/Wiederholungen
N/A	nicht bestimmt, nicht verfügbar
NC#1	Negativkontrolle
NN	normale Nierengewebe
ns	nicht signifikant
p	perinukleär
RCC	Nierenzellkarzinom
RIN	RNA Integrity Number
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-qPCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
T	Tumor
TMA	Tissue-Microarray
TSA	Trichostatin A
ü N	über Nacht
UICC	Union internationale contre le cancer
VHL	von Hippel-Lindau
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

6.6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich nun bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich während der vergangenen Jahre so großartig unterstützt haben.

In erster Linie gilt mein Dank der Stiftung Urologische Forschung und im Besonderen Herrn Prof. Loening und Herrn Prof. Schnorr, die mir durch das Stipendium der BFIU meine Promotion überhaupt erst ermöglicht haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Herrn Prof. Jung für sein stetes Interesse und die geduldige Betreuung meiner Arbeit. Seine unermüdliche Begeisterung für die Forschung konnte mich immer wieder aufs Neue motivierte.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Krüger sowie den weitem Gutachtern und Kommissionsmitgliedern durch deren Hilfe der Abschluss meiner Promotion realisiert werden konnte.

Ebenso geht mein Dank natürlich an die Damen (und die vereinzelt Herren) der Forschungsabteilung der Klinik für Urologie. Danke für die großartige Einarbeitung in den Laboralltag und jegliche Hilfestellung und Unterstützung. Auch bedanken möchte ich mich bei Herrn Kilic für die Geduld bei der Auswertung meines TMA's.

Vielen Dank auch an meine aktuellen und ehemaligen Mitstipendiatinnen in Mitte und auch am MDC. Danke an Nadine, Zofia, Yesim, Annika, Isabel und Bianca für die moralische Unterstützung in allen Höhen und Tiefen der letzten Jahre. Ganz besonders will ich dabei Linda danken, die mit mir gemeinsam die letzte entscheidende und zeitweise auch nervenaufreibende Phase der Promotion durchgezogen hat.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, deren bedingungslosen und uneingeschränkten Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte. Dennis, dir danke ich für deine Geduld, dass du mich in jeder Lebenslage immer wieder zum Lachen bringst und mir zeigst, was im Leben wirklich wichtig ist.

Ich danke euch allen von Herzen!

6.7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 06. Juli 2009.

Julia Liep

Berlin, Januar 2016